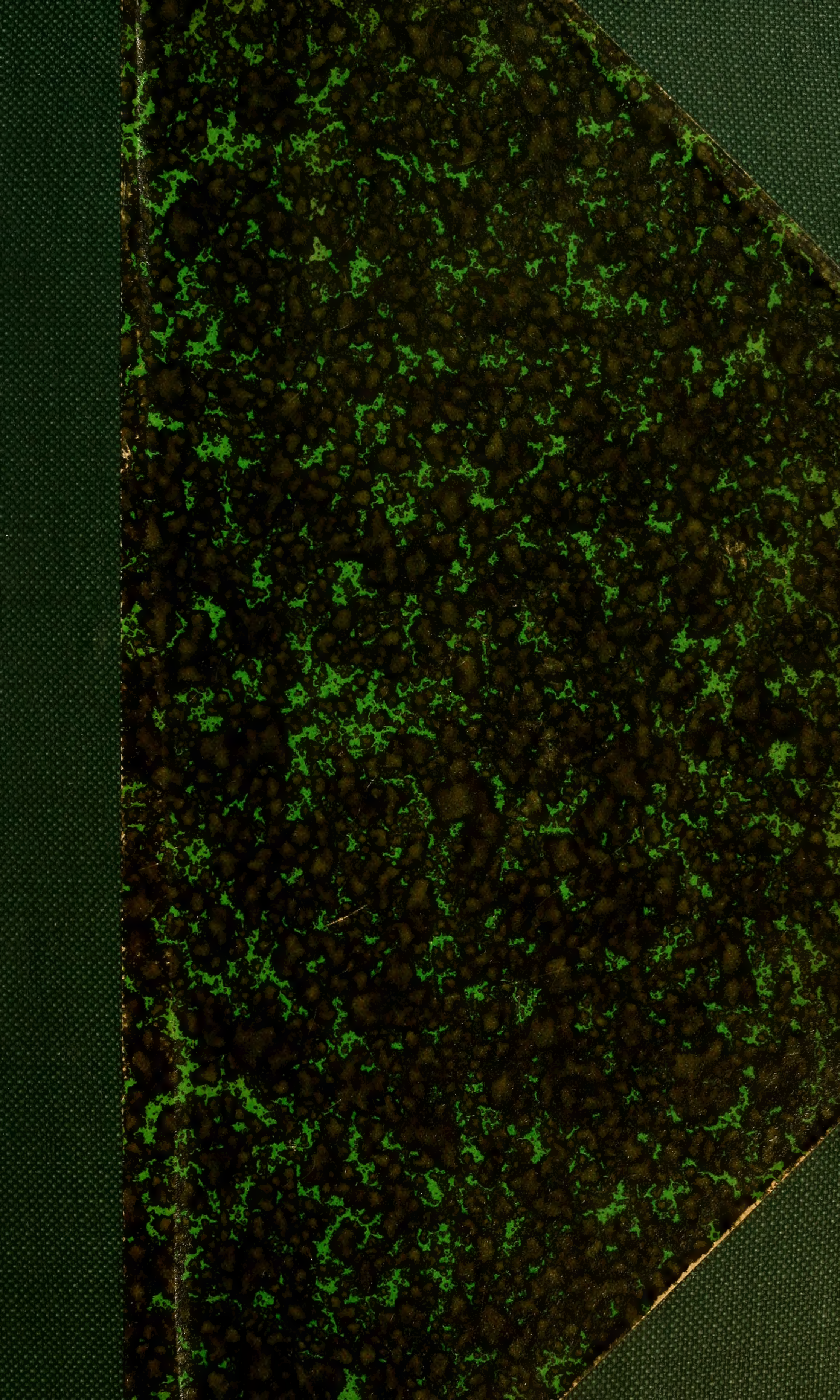
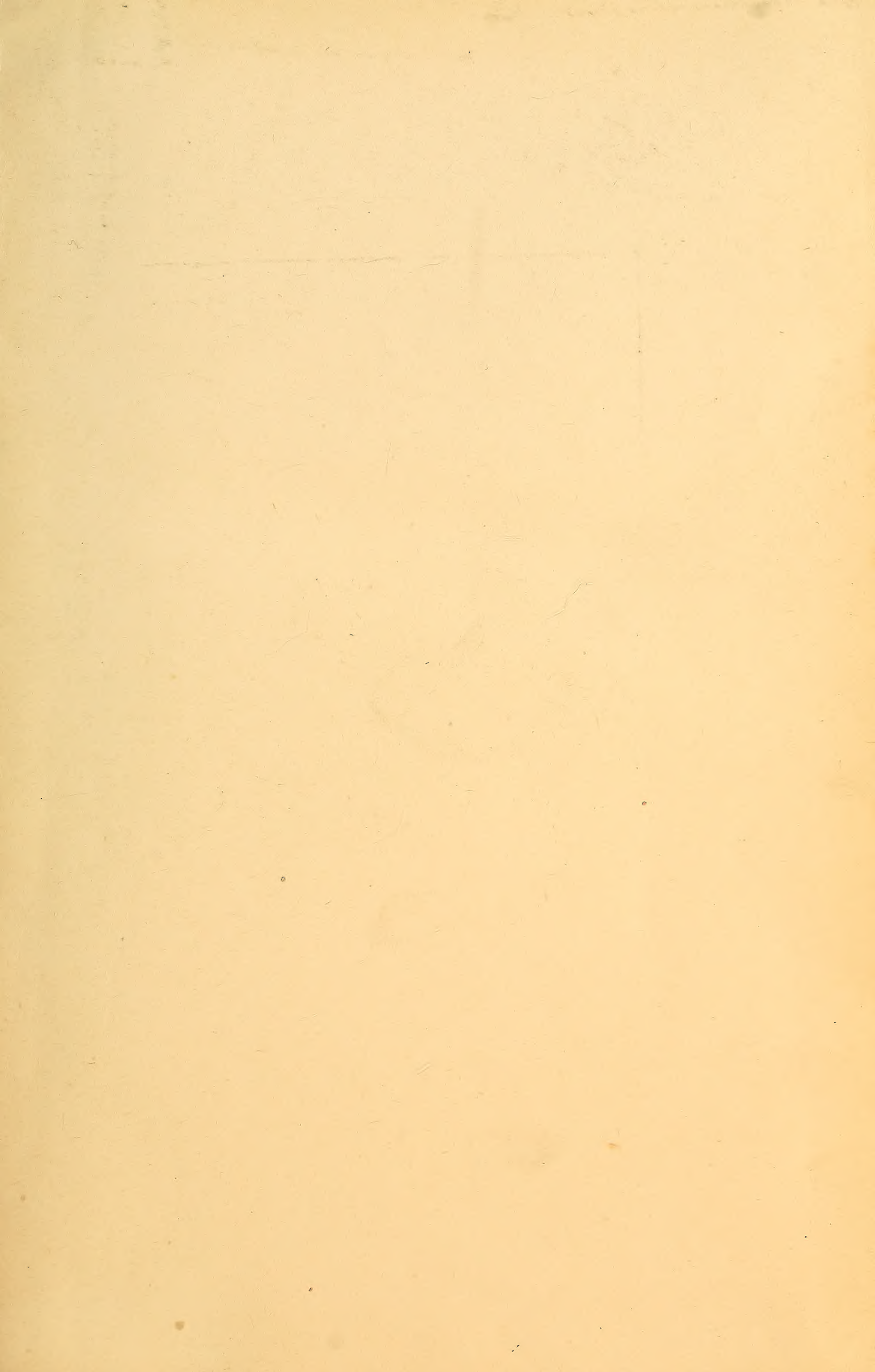
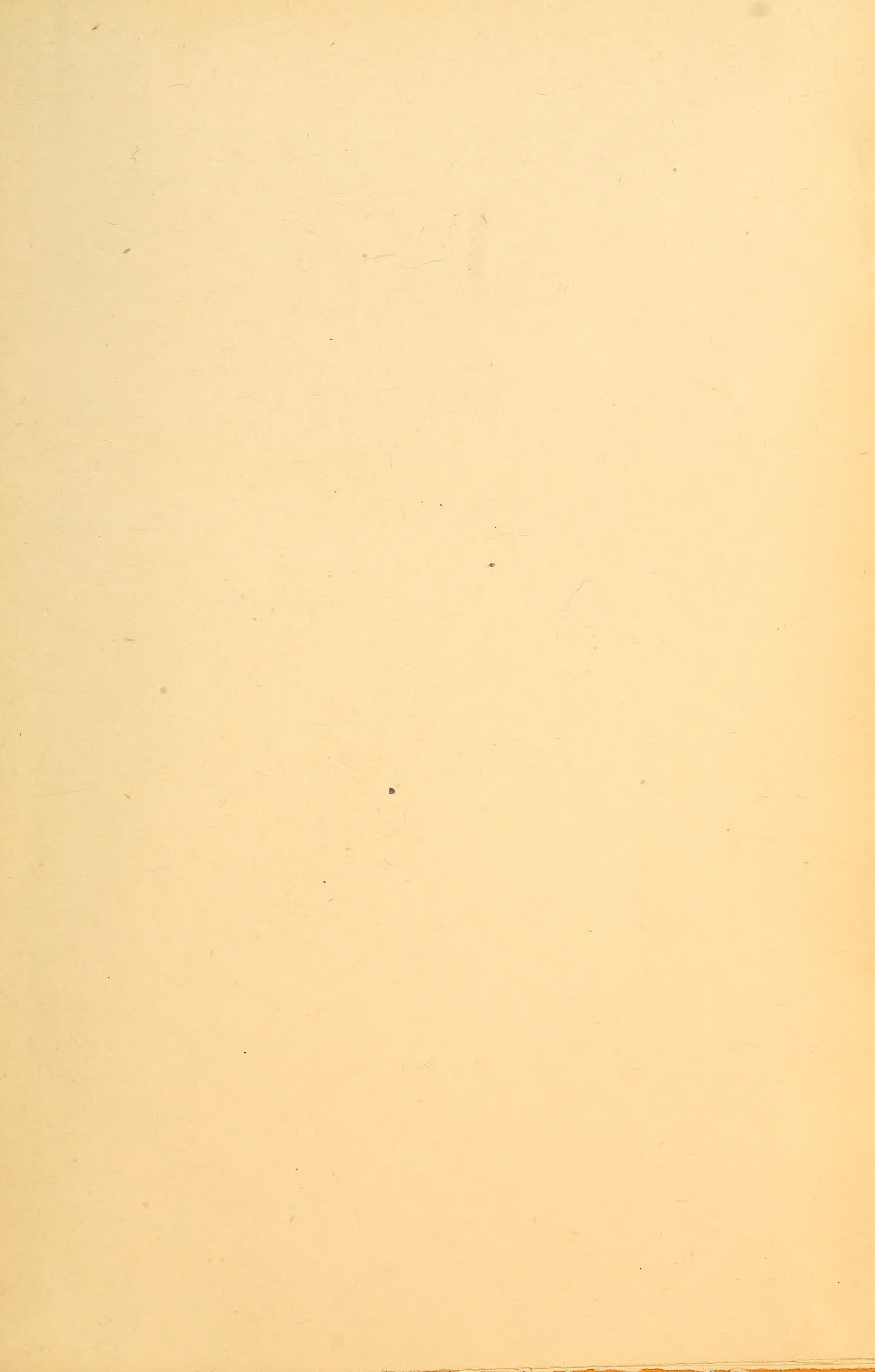










BEITRÄGE

ZUR

CHEMISCHEN PHYSIOLOGIE

UND

PATHOLOGIE

NEUNTER BAND



BEITRÄGE

ZUR

CHEMISCHEN PHYSIOLOGIE

UND

PATHOLOGIE

ZEITSCHRIFT FÜR DIE GESAMTE BIOCHEMIE

UNTER

MITWIRKUNG VON FACHGENOSSEN HERAUSGEGEBEN

VON

FRANZ HOFMEISTER

O. PROFESSOR DER PHYSIOLOGISCHEN CHEMIE AN DER UNIVERSITÄT STRASSBURG

NEUNTER BAND

BRAUNSCHWEIG

DRUCK UND VERLAG VON FRIEDRICH VIEWEG UND SOHN

1907

INHALT DES NEUNTEN BANDES.

A. Abhandlungen.

B. Kürzere Mitteilungen.

Beiträge
zur
Chemischen Physiologie
und
Pathologie

Zeitschrift für die gesamte Biochemie

unter

Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben

von

Franz Hofmeister

o. Professor der physiologischen Chemie an der Universität Straßburg

---

IX. Band 1. und 2. Heft

(Ausgegeben Oktober 1906)

Braunschweig

Druck und Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn

1906

Inhalt des 1. und 2. Heftes.

Die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie“ erscheinen in zwanglosen Heften, von denen 12 einen Band von etwa 30 Druckbogen zum Preise von M. 15,— bilden.

Die Ausgabe der Hefte erfolgt nach Maßgabe des einlaufenden Materials in kurzen Zwischenräumen. Die Zahl der in einem Jahre erscheinenden Bände soll zwei nicht überschreiten.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Straßburg i. E., Wimpfelingstraße 2, zu richten.

Bei der Aufnahme von Arbeiten in die „Beiträge“ soll in erster Reihe deren biologisches Interesse, sodann Exaktheit der Durchführung, Sachlichkeit, Knappheit und Übersichtlichkeit der Darstellung maßgebend sein. Polemische Ausführungen, welche den Rahmen einer tatsächlichen Richtigstellung überschreiten, können nicht Aufnahme finden. Der kurzen Mitteilung neuer Befunde bleibt ein besonderer Raum vorbehalten. Solchen „kürzeren Mitteilungen“ kann ein besonders rasches Erscheinen zugesichert werden.

Die Mitarbeiter erhalten ein Honorar von M. 40,— für den Druckbogen und 50 Sonder-Abzüge.

I.

Über die Mengenverhältnisse der Muskeleiweißkörper unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.

Zugleich ein Beitrag zur Kenntnis der Totenstarre.

Von Dr. med. **Paul Saxl.**

Ausgeführt unter Leitung des Privatdozenten Dr. Otto v. Fürth, Assistenten am k. k. physiologischen Institut der Universität in Wien.

Während zahlreiche in der Literatur vorliegende Untersuchungen über Muskeleiweißkörper sich mit der chemischen Charakterisierung derselben beschäftigen, ist der Frage der Mengenverhältnisse der einzelnen Eiweißkörper im Muskel bisher nur wenig Aufmerksamkeit geschenkt worden und sind selbst die nächstliegenden Probleme auf diesem Gebiete ungelöst geblieben.

Auf die große Zahl von Arbeiten, welche die qualitative Untersuchung der Eiweißkörper zum Gegenstande haben, soll hier nicht näher eingegangen werden. Es sei nur erwähnt, daß man seit langer Zeit die Eiweißkörper des Muskels in zwei Gruppen sondert: In die durch Neutralsalzlösungen extrahierbaren löslichen Eiweißkörper des „Muskelplasmas" und in den nach vollständiger Extraktion zurückbleibenden Rest schwerlöslicher Eiweißsubstanzen, das „Muskelstroma".

Das Muskelplasma der Warmblüter besteht nach v. Fürth[1]) aus zwei verschiedenen Eiweißkörpern: Einerseits aus dem globulinartigen Myosin, das bei 40 bis 45° gerinnt und bei Zimmertempe-

[1]) O. v. Fürth, Über die Eiweißkörper des Muskelplasma, Arch. f. exper. Path. u. Physiol. **36**, 231 (1895). Vgl. auch die Zusammenstellung der einschlägigen Literatur: v. Fürth, Zur Gewebschemie des Muskels. Ergebnisse der Physiologie **1**, 1902.

ratur bei längerem Stehen teilweise in die geronnene Modifikation (Myosinfibrin) übergeht; andererseits aus dem „Myogen", das bei 55 bis 65° koaguliert und sich spontan in „lösliches Myogenfibrin" verwandelt; dieses wieder geht bei längerem Stehen allmählich, bei Erhitzen auf 40° sofort, in „unlösliches Myogenfibrin" über.

I. Myosin → Myosinfibrin

II. Myogen → lösliches Myogenfibrin → unlösliches Myogenfibrin

Noch vor dem Erscheinen der letztgenannten Arbeit wurden die Mengenverhältnisse der Eiweißkörper von Danilewsky [1]) untersucht. Danilewsky, der für die Gesamtheit der Plasmaeiweißkörper die Bezeichnung „Myosin" gebrauchte, extrahierte den Muskel so lange mit 15 proz. Salmiaklösung, bis die Flüssigkeit kein bei 65° koagulierbares Eiweiß mehr aufnahm. Der unlösliche Eiweißrückstand wurde als „Stroma" bezeichnet; den Salmiakextrakt erhitzte Danilewsky auf 65°, trocknete und wog dann das Koagulum wie das Stroma. Auf diese Weise gelangte Danilewsky zu einer Reihe von Normalwerten für das Verhältnis Plasma zu Stroma. Diese Werte zeigten für die verschiedenen Tierarten außerordentlich große Abweichungen voneinander. „Diese Verschiedenheit", sagt Danilewsky, „hängt aber nicht von der Stellung der Tierart, sondern von der Kontraktionsart der Muskeln ab; je schneller die Kontraktionen und Erschlaffungen der Muskeln ausgeführt werden, desto reicher sind die letzteren an Gerüstsubstanzen im Verhältnis zu Myosin. Der größere relative Gehalt des Muskels an Gerüstsubstanz geht mit der größeren inneren Beweglichkeit Hand in Hand... Ist hingegen ein Muskel gezwungen, seine frühere Tätigkeit zu verlangsamen (hypertrophisches Herz), so vermehrt sich das Myosin zu Ungunsten des Stromas." — Danilewsky sieht in der letzterwähnten Tatsache den Beweis dafür, daß Bündelgerüst in Plasma übergehen kann. Wir kommen auf diese Behauptung sowie auf eine eingehende Besprechung der von Danilewsky gefundenen Werte später zurück.

v. Fürth (l. c.) untersuchte das Mengenverhältnis der einzelnen Eiweißkörper im Muskelplasma. Er fand im

---

[1]) A. Danilewsky, Über die Abhängigkeit der Kontraktionsart der Muskeln von den Mengenverhältnissen ihrer Bestandteile. Zeitschr. f. physiol. Chemie 7, 125 (1882).

Kaninchenplasma:

	Niederschlag in g			Niederschlag in Proz.
	I	II	Mittel	
a) Gesamteiweiß	0,4198	0,4232	0,4215	100
b) 5 Minuten bei 40° = präform. Myogenfibrin	unbestimmbare Spuren			—
c) 5 Minuten bei 50° = Myosin[1]	0,0735	0,0770	0,0752	17,88
d) 5 Minuten bei 70° = Myosin + Myogen[1])	0,4082	—	—	96,84
e) Albumin	—	—	—	3,16

Das Verhältnis des Myosins zum Myogen stellt sich in diesem Versuche auf 18:79.

	Versuch III Proz.	Versuch IV Proz.	Versuch Va Proz.	Versuch Vb Proz.
Präformiertes Myogenfibrin	0,82	unbestimmbar		
Myosin[1])	nicht bestimmt	17,24	16,25	22,52
Myogen	nicht bestimmt	82,76	83,75	77,48

Aus diesen Werten folgert v. Fürth, „daß die Menge des im Kaninchenplasma präformiert vorhandenen löslichen Myogenfibrins stets eine sehr geringe ist und kaum je 1 Proz. des Gesamteiweißes erreicht". Ferner: „Daß das Verhältnis des Paramyosinogens zum Myosinogen im Muskelplasma sich annähernd wie 1:3 bis 1:4 stellt."

Eine Reihe von Autoren beschäftigte sich mit der Änderung der Eiweißzusammensetzung des Muskels bei der Tätigkeit. Kurajeff[2]) fand durch Analysen von Frosch-, Kaninchen- und Hundemuskeln, daß die Muskeln bei der Kontraktion einen Teil ihrer festen Bestandteile verlieren. Dieser Verlust soll insbesondere

[1]) Das Myosin entspricht dem „Paramyosinogen", das Myogen dem „Myosinogen" Halliburtons.

[2]) D. J. Kurajeff, Über das Verhältnis des Eiweißgehaltes des tätigen und ruhenden Muskels, Wratsch 1895, Nr. 39. Derselbe: Über die Restitution der festen Bestandteile und Eiweißkörper während des Ausruhens nach geleisteter Arbeit. Russ. Arch. für Pathologie 2, 597 (1896). Zitiert nach v. Fürth, Zur Gewebschemie des Muskels 1, 19.

durch die Abnahme eines globulinartigen Eiweißkörpers im Muskel bedingt sein. Ferner fand Slosse bei elektrischer Reizung sowie bei Strychnintetanus eine Steigerung des Ammoniakgehaltes im Muskel und schloß daraus auf einen Eiweißverbrauch bei der Muskeltätigkeit.

A. Steyrer[1]), der mit einer ähnlichen Methode wie v. Fürth arbeitete, fand bei Tetanisierung vom Nerven aus eine Verminderung des Myosins im Plasma. Bei der Degeneration nach Nervendurchschneidung scheint Myosin im Muskel aufgespeichert, bzw. langsamer verbraucht zu werden. In einem von seinem Insertionspunkt abgelösten Muskel bleibt das Verhältnis Myosin zu Myogen annähernd unverändert.

Daß auch die Totenstarre einen Einfluß auf die Eiweißzusammensetzung des Muskels ausübt, wurde von vielen Autoren angenommen. Kühne beobachtete Gerinnselbildung im isolierten Muskelplasma; diese Beobachtung führte ihn zu der Anschauung, daß die Totenstarre ein Gerinnungsvorgang sei, den er mit der Spontangerinnung des Blutplasmas verglich. Auch Nasse[2]) und viele andere vertraten diese Anschauung. v. Fürth[3])[4]) hat die Gerinnselbildung im Muskelplasma nach seinem oben mitgeteilten Schema gedeutet und die Bedingungen derselben sowie ihre mutmaßlichen Beziehungen zur Totenstarre eingehender studiert.

Während sich diese Untersuchungen nur auf isoliertes Muskelplasma bezogen, brachte O. Folin[5]) Froschmuskeln durch Gefrieren in einen Starrezustand. Der Vergleich starrer und frischer Muskeln ergab bei Extraktion mit physiologischer Kochsalzlösung einen annähernd gleichen Gehalt an koagulablem Eiweiß; daraus schloß Folin, daß die Totenstarre von der Eiweißgerinnung unabhängig ist.

Wie aus dem Mitgeteilten hervorgeht, sind die vorliegenden Versuche keineswegs ausreichend, um zu klaren Anschauungen über die Eiweißzusammensetzung des Muskels zu führen. Ich stellte mir daher die Aufgabe, in quergestreifter, glatter und Herzmusku-

---

[1]) A. Steyrer, Ein Beitrag zur Chemie des entarteten Muskels. Diese Beiträge 4 (1904).

[2]) O. Nasse, Chemie und Stoffwechsel des Muskels. In Hermanns Handb. d. Physiologie I.

[3]) l. c.

[4]) v. Fürth, Über die Gerinnung der Muskeleiweißkörper und deren mutmaßliche Beziehung zur Totenstarre. Diese Beiträge 3, 543 (1903).

[5]) O. Folin, Rigor mortis, American Journal of physiol. 9.

latur unter verschiedenen, teils physiologischen, teils pathologischen Bedingungen die absolute Menge der Muskeleiweißkörper und ihr Mengenverhältnis zueinander zu bestimmen. Da bei der langen Dauer der Versuche eine Interferenz der Totenstarre nicht ohne weiteres ausgeschlossen werden konnte, galt es zunächst ihren Einfluß auf die Eiweißzusammensetzung des Muskels festzustellen und eventuell Mittel und Wege zu finden, ihn hintanzuhalten. Erst nach Erledigung dieser wichtigen Vorfrage konnte die systematische Untersuchung normaler und pathologisch veränderter Muskulatur mit Erfolg in Angriff genommen werden.

1. Untersuchungsmethode.

Die Methodik der Versuche war im allgemeinen folgende: Die dem Tiere sofort post mortem entnommenen Muskeln wurden aufs feinste zerhackt, 20 g davon abgewogen, mit Wasser vom anhaftenden Blute gereinigt, sodann in einer Reibschale mit 75 g einer Neutralsalzlösung (s. u.) aufs sorgfältigste verrieben, mit Toluol versetzt und etwa drei bis mehrere Stunden stehen gelassen. Sodann wurde der Muskelbrei mit Hilfe eines Koliertuches aus Rohseide und einer Handpresse ausgepreßt und das Filtrat sorgfältig aufgefangen, der Muskelrückstand mittels eines Spatels in die Reibschale zurückgebracht, wieder mit 75 g Neutralsalzlösung verrieben und unter Toluol mehrere Stunden stehen gelassen, neuerdings abgepreßt und dieser Vorgang so oft wiederholt, bis in dem abgepreßten Filtrat kein durch Hitze koagulables Eiweiß mehr nachweisbar war. Auf diese Weise gelang es bei einiger Übung und Sorgfalt, das lösliche Eiweiß vollständig und unter Vermeidung in Betracht kommender Verluste zu extrahieren. Der zurückbleibende Muskelrückstand, das „unlösliche Eiweiß“ oder „Stroma“, wurde sorgfältig salzfrei gewaschen, im Trockenschrank bei 105° getrocknet und gewogen. — Im Filtrate wurde — meist sofort — Myogenfibrin, Myosin und Myogen bestimmt. Da wägbare Mengen von Myogenfibrin in zahlreichen Versuchen nicht nachweisbar waren, wurde späterhin das Filtrat jedesmal einfach in zwei Hälften geteilt. Die eine Hälfte wurde auf 50 bis 52° erhitzt und etwa 7 Minuten lang bei dieser Temperatur erhalten, die zweite bei Siedehitze koaguliert. Die Niederschläge wurden auf Rohseidefiltern gesammelt, mit Wasser sorgfältig salzfrei gewaschen, mit Hilfe eines Spatels in eine Kristallisierschale gebracht, im Trockenschrank getrocknet und gewogen. So wurde das Myosin

und Myogen gesondert bestimmt, insoweit es auf die gesonderte Bestimmung dieser Eiweißkörper ankam; dort, wo es genügte, die Gesamtmenge der löslichen Eiweißkörper festzustellen, wurden die vereinigten unter Toluolzusatz aufbewahrten Filtrate zur Siedehitze koaguliert und die Koagula wie oben weiter behandelt. — Schließlich sei noch erwähnt, daß die Muskelpartikelchen in den Neutralsalzlösungen aufquollen und häufig mit der Schere neuerdings zerschnitten werden mußten, um eine möglichst vollständige Extraktion zu erzielen.

Bei der Verwendung verschiedener Neutralsalzlösungen ergab sich, daß das Extraktionsvermögen derselben für die koagulablen Muskeleiweißkörper sehr ungleich ist. Es wurde zunächst physiologische Kochsalzlösung verwendet. Ein solcher Versuch sei hier wiedergegeben:

20 g frischer Kaninchenmuskulatur wurden mit physiologischer NaCl-Lösung in oben beschriebener Weise vollständig extrahiert, bis in dem Extrakt kein koagulables Eiweiß mehr nachweisbar war. Sodann wurde dem Muskelrückstand konzentrierte Kochsalzlösung zugesetzt. Das Extrakt enthielt abermals kein durch Hitze koagulables Eiweiß. Jetzt wurde dem mit Kochsalzlösung erschöpften Muskelrückstand 10 proz. Salmiaklösung zugesetzt; mit dieser ließ sich noch reichlich lösliches Eiweiß extrahieren. Es ergaben sich bei diesem Versuche folgende Zahlen:

Versuchstabelle 1.

Aus 20 g frischer Kaninchenmuskulatur wurden erhalten:

Durch physiologische NaCl-Lösung	0,63 g	= 19 Proz.	des Gesamteiweißgehaltes des Muskels.
Durch hierauf zugesetzte konz. NaCl-Lösung	0,00 g		
Durch hierauf zugesetzte 10 proz. Salmiaklösung	1,50 g	= 44 „	
Gesamtlösliches Eiweiß	2,13 g	= 63 Proz.	
Unlösliches Eiweiß	1,20 g	= 37 „	

In gleicher Weise wurde eine von einem anderen Kaninchen stammende Muskelportion von 20 g mit 10 proz. Ammonsulfatlösung erschöpft und sodann mit 10 proz. Ammoniumchloridlösung extrahiert (s. Tabelle 2).

Man sieht aus dem Kontrollversuche, der an einer zweiten Portion derselben Muskulatur gemacht wurde, die gute Übereinstimmung der Werte, die einerseits durch ausschließliche Extraktion mit Salmiaklösung, andererseits durch anfängliche Erschöpfung mit Ammonsulfat und hierauf folgende endgültige Extraktion mit Salmiak gewonnen wurden.

Aus diesen mehrfach wiederholten Versuchen geht hervor, daß das Extraktionsvermögen der Neutralsalzlösungen für das lös-

Versuchstabelle 2.

Kaninchen 2200 g; je 20 g Muskulatur enthalten:

Tag und Stunde der Bestimmung	Der Muskelbrei wurde stehen gelassen	Extrahiert mit 10 proz. NH_4Cl-Lösung				Extrahiert mit 10 proz. $(NH_4)_2SO_4$-Lösung			
		Myosin	Myogen	Gesamtes koag. Eiweiß	Stroma	Myosin	Myogen	Gesamtes koag. Eiweiß	Stroma
		in Grammen				in Grammen			
27. II. 3 Uhr	2 Stunden	0,30	0,54	0,84	—	Spuren	0,52	0,52	—
6 „	3 „	0,38	1,00	1,38	—	„	0,50	0,50	—
8 „	2 „	0,16	0,52	0,68	—	„	0,30	0,30	—
28. II. 1 „	17 „	Spuren	0,16	0,16	—	keines	0,24	0,24	—
5 „	4 „	keines	0,12	0,12	—	„	0,16	0,16	—
1. III. 1 „	19 „	„	0,11	0,11	—	„	0,13	0,13	—
6 „	5 „	„	0,07	0,07	—	„	0,10	0,10	—
2. III. 1 „	19 „	„	Spuren	—	—	Geringste Spuren			
6 „	5 „	„	keines	—	—	keines			
						Forts. der Extraktion mit 10 % NH_4Cl-Lösung			
3. III. 9 „	15 „	—	keines	—	—	0,16	0,29	0,45	—
6 „	9 „	—	—	—	—	0,40	0,55	0,95	—
4. III. 6 „	24 „	—	—	—	—	Spuren	0,10	0,10	—
5. III. 6 „	24 „	—	—	—	—	keines			
Summe in Grammen		0,84	2,52	3,36	1,80	0,56	2,89	3,45	1,67

liche Muskeleiweiß ungleich ist: Kochsalz extrahiert nur einen geringen Bruchteil des löslichen Eiweißes, 10 proz. Ammonsulfat einen größeren Bruchteil, 10 proz. Salmiaklösung hingegen extrahiert weitaus am besten. Wir verwendeten daher dieses von Danilewsky empfohlene Extraktionsmittel in allen folgenden Versuchen.

Um ein Bild, wie sich solch eine Extraktion darstellt, zu geben, führen wir folgenden Versuch an. (Warum dieser und andere Versuche unter Eiskühlung angestellt wurden, soll im nächsten Kapitel ausgeführt werden.)

Der Versuch zeigt den typischen Verlauf der Extraktion: Die ersten drei bis fünf Filtrate enthalten reichlich koagulables Eiweiß, das immer spärlicher wird, um schließlich ganz zu verschwinden. Dabei findet sich Myosin in wägbarer Menge nur in jenen Filtraten, die sehr reichlich Myogen enthalten. — Das Filtrat war in den meisten Versuchen klar, zuweilen aber durch

feinste Eiweißkoagula getrübt, die wegen ihrer unwägbaren Menge nicht in Betracht kamen.

Versuchstabelle 3.

Junges Kaninchen; 20 g frischer Muskulatur werden sofort post mortem in Untersuchung genommen; der Muskelbrei steht während der ganzen Versuchsdauer unter Eiskühlung.

Extraktionsnummer	Der Muskelbrei wurde stehen gelassen	Das Filtrat enthält in Grammen			
		Myosin	Myogen	Gesamtes koaguliertes Eiweiß	Stroma
I . . .	3 Stunden	0,08	0,48	0,56	—
II . . .	3 „	0,20	0,88	1,08	—
III . . .	3 „	Spuren	0,50	0,50	—
IV . . .	15 „	0,26	0,60	0,86	—
V . . .	24 „	Spuren	0,42	0,42	—
VI . . .	5 „	keines	0,10	0,10	—
VII . . .	19 „	„	0,06	0,06	—
VIII . . .	24 „	„	Spuren	Spuren	—
IX . . .	24 „	„	keines	keines	0,50
	Summa	0,54	3,04	3,58	0,50

Demnach enthielt die Muskelmenge von 20 g:

In Grammen					In Prozenten des gesamten Muskeleiweißes			
Gesamteiweißgehalt	Myosin	Myogen	Gesamtes koag. Eiweiß	Stroma	Myosin	Myogen	Gesamtes koag. Eiweiß	Stroma
4,08	0,54	3,04	3,58	0,50	13,1	74,6	87,7	12,3

Die Extraktion war in der Regel nach acht bis zehn Teilextraktionen vollendet; die ersten Auszüge müssen möglichst rasch gemacht werden; es wurde daher im Beginne der einzelnen Versuche alle zwei bis drei Stunden extrahiert; die letzten Portionen wurden stets etwa 20 Stunden stehen gelassen, um die letzten Reste der löslichen Eiweißkörper zu extrahieren. — Auf diese Weise nahm die vollständige Erschöpfung eines Muskels zwei bis drei Tage in Anspruch.

2. Einfluß der Totenstarre auf die Eiweißzusammensetzung des Muskels.

Um den Einfluß der Totenstarre auf die Eiweißzusammensetzung des Muskels zu studieren, wurden Parallelversuche mit

frischem und starrem Muskel angestellt: Zu diesem Zwecke war mehr Muskulatur erforderlich, die durch Entnahme einer größeren Zahl von Extremitätenmuskeln eines Kaninchens gewonnen wurde. Je 20 g der gut zerkleinerten und gemischten Muskelmasse wurden in möglichst frischem Zustande sofort zur Extraktion angesetzt, 20 g derselben Muskelmenge dagegen unter Toluolzusatz in feuchter Kühlkammer 24 Stunden stehen gelassen und erst nach Eintritt der Totenstarre extrahiert.

a) Eine Reihe von Versuchen und die bekannte Tatsache, daß Wärme den Eintritt der Totenstarre begünstigt, Kälte ihn verzögert, führte zu dem naheliegenden Gedanken, daß die Außentemperatur, unter der die genannten Versuche angestellt wurden, von besonderer Bedeutung für das Ergebnis sei. Es stellte sich als zweckmäßig heraus, den „frischen" Muskel, der nicht totenstarr werden sollte, sofort nach dem Tode des Versuchstieres, nachdem man ihn möglichst rasch zerkleinert, gewogen und mit Salmiaklösung versetzt hatte, unter Eiskühlung zu stellen und ihn daselbst bis zur Beendigung der Extraktion zu belassen. Nur zum Zweck der einzelnen Extraktionen wurde der Muskelbrei der Eiskühlung entnommen; die Manipulation des Extrahierens wurde in einem kühlen Raume vorgenommen. Auf diese Weise gelang es, ein Maximum von löslichem Eiweiß zu extrahieren. — Die Muskelportion, die bestimmt war, totenstarr zu werden, wurde stets bei Zimmertemperatur belassen.

Wir geben hier auf diese Weise ausgeführte Versuche wieder. (Siehe Versuchstabelle 4.)

Vergleichen wir in diesen Versuchen die Zahlenwerte für die gesamten extrahierbaren Eiweißkörper (Plasma) und für den unlöslichen Eiweißrückstand (Stroma) beim frischen und totenstarren Muskel, so ergibt sich, daß der „frische" Muskel (Plasma 87 Proz., 88,5 Proz., 78,4 Proz.) viel plasmareicher ist als der totenstarre (Plasmawerte 28,5 Proz., 28,5 Proz., 26,8 Proz.). Umgekehrt verhalten sich natürlich die Zahlen für den Stromagehalt im frischen und starren Muskel. Der frische Muskel enthält 12,5 Proz., 11,5 Proz., 21,6 Proz., der totenstarre 71,5 Proz., 71,5 Proz., 73,2 Proz. unlösliches Eiweiß. Im frischen Muskel übertrifft also die Menge der löslichen Eiweißkörper ganz bedeutend diejenige des Stromas. Das Verhältnis von Plasma zu Stroma ist im Durchschnitt 84 zu 16 Proz. Im totenstarren Muskel hingegen beträgt das Verhältnis 28 zu 72 Proz.

Versuchstabelle 4.

Es enthalten je 20 g quergestreifter Muskulatur:

Gewicht des Kaninchens	Frisch (unter Eiskühlung)							
	In Grammen				In Prozenten d. Gesamteiweißes			
	Myosin	Myogen	Gesamtes koag. Eiweiß	Stroma	Myosin	Myogen	Gesamtes koag. Eiweiß	Stroma
a) 1500 g .	0,54	3,04	3,58	0,50	13,5	73,8	87,3	12,5
	0,50	2,98	3,48	0,46	12,0	76,5	88,5	11,5
b) 1300 g .	0,60	2,50	3,10	0,80	15,1	63,3	78,4	21,6
	Totenstarr (bei Zimmertemperatur)							
a) 1500 g .	0,26	0,86	1,12	2,87	6,5	22,0	28,5	71,5
b) 1300 g .	0,32	0,73	1,05	2,98	8,0	18,8	26,8	73,2

Aus diesem regelmäßig wiederkehrenden Verhalten ergibt sich die Tatsache, daß durch die Totenstarre eine große Menge löslichen Eiweißes unlöslich wird. Indem ein großer Teil der Plasmaeiweißkörper in einen geronnenen schwerlöslichen Zustand übergeht und sich so der Fraktion von vornherein schwerlöslicher Stromaeiweißkörper hinzuaddiert, erscheint das Zahlenbild der Eiweißzusammensetzung des quergestreiften frischen Muskels als ein ganz anderes als das des totenstarren. Dieses Zahlenbild ist so charakteristisch, daß man aus ihm ersehen kann, ob der untersuchte Muskel in frischem oder totenstarrem Zustande extrahiert worden ist.

Dabei sei darauf hingewiesen, daß die gefundenen Stromawerte für den frischen Muskel jedenfalls noch etwas höher sind, als es der Fall wäre, wenn man den Eintritt der Totenstarre wirklich ganz zu verhindern imstande wäre. Da aber die strengste Eiskühlung den Eintritt der Totenstarre nur verzögert und nicht gänzlich hintanhält, da ferner die Manipulation bei der Extraktion ohne Eiskühlung stattfindet, so gerinnt jedenfalls ein, wenn auch kleiner, Bruchteil der löslichen Eiweißkörper. Daraus erklärt sich auch die Differenz der Stromawerte bei den oben angeführten beiden Kaninchen (12 und 21,6 Proz.). Bei dem zweiten Kaninchen ist offenbar, trotz Eiskühlung, ein größerer Bruchteil des „löslichen" Eiweißes geronnen als bei dem ersten. Den größten Plasmawert = 91,1 Proz. fanden wir in dem Brustmuskel einer Taube. Siehe Kap. 3.

b) Den Einfluß der Temperatur mögen einige weitere Versuche veranschaulichen, in denen der frische Muskel nach Zusatz von Salmiaklösung bei Zimmertemperatur extrahiert wurde.

Versuchstabelle 5.

Es enthalten je 20 g quergestreifter Muskulatur:

Gewicht des Kaninchens	In Grammen				In Prozenten des Gesamteiweißgehaltes			
	Myosin	Myogen	Gesamtes koag. Eiweiß	Stroma	Myosin	Myogen	Gesamtes koag. Eiweiß	Stroma
2600 g . . .	0,80	2,95	3,75	1,73	14,3	53,7	68,0	32,0
2200 g . . .	0,94	2,32	3,26	1,80	18,2	48,7	66,9	33,1
1500 g . . .	0,50	1,97	2,47	1,45	13,0	50,1	63,1	36,9

Es sei ferner auf die Versuche 1 und 2 hingewiesen, die eben falls bei Zimmertemperatur angestellt wurden. Alle diese Versuche zeigen ein ziemlich übereinstimmendes Verhalten. Das Stroma beträgt etwa ein Drittel, das Plasma zwei Drittel des Gesamteiweißgehaltes. Vergleicht man diese Werte mit den in Versuch 4 bis 6 unter Eiskühlung gewonnenen Zahlen (Stroma etwa ein Achtel, Plasma sieben Achtel des Gesamteiweißgehaltes), so ist wohl eine bedeutende Abnahme des Plasmas und eine entsprechende Zunahme des Stromas zu konstatieren; das Plasma überwiegt aber noch immer wesentlich den Stromagehalt; es ist daher in diesen bei Zimmertemperatur angestellten Versuchen ein Teil des Plasmas geronnen, es ist eine partielle Totenstarre eingetreten.

Da jeder dieser Versuche etwa drei Tage gedauert hat, kann man sich das Ausbleiben der vollständigen Totenstarre nur durch die Annahme erklären, daß die zugesetzte Neutralsalzlösung den Eintritt einer Gerinnung in jenem Umfange, in dem diese sonst stattzufinden pflegt, verhindert hat; da wir ferner sehen, daß in allen fünf Versuchen prozentisch annähernd dieselbe Plasmamenge geronnen ist, werden wir zu der Annahme gedrängt, daß diese Beeinflussung der Totenstarre durch die Neutralsalzlösung eine bestimmte, in allen Fällen gleich verlaufende ist. Besonders augenfällig tritt diese Tatsache im Versuch 1 und 2 zu Tage. In Versuch 1 (s. d.) wurden zuerst 10 Kochsalzextraktionen gemacht, die drei Tage dauerten; es konnten nur 19 Proz. des Gesamteiweißes extrahiert werden; nach dieser Zeit konnten mit 10 proz. Salmiaklösung noch 44 Proz. des Gesamteiweißes extrahiert werden. Das chemische Gesamtbild dieses Versuches zeigt nur eine partielle, keineswegs aber eine vollkommene Gerinnung des Muskels. — Ein ähnliches Bild zeigt Versuch 2. Durch 10 proz. Ammonsulfatlösung konnte nur ein Teil des löslichen Eiweißes extrahiert werden und die Fortsetzung der Extraktion mit 10 proz. Ammoniumchloridlösung förderte noch eine ansehnliche Menge löslichen Eiweißes zutage. In dem Parallelversuche wurde nur mit 10 proz. Ammoniumchloridlösung extrahiert. Da die Mengen des extrahierten Plasmas in beiden Parallelversuchen gleich

waren, liegt die Annahme nahe, daß die Salmiaklösung die Gerinnung im Muskel in gleicher Weise verzögere wie das Ammonsulfat.

Daß Muskeln, die post mortem in Neutralsalzlösung gelegt werden, langsamer totenstarr werden, wird schon von Nasse (l. c.) angegeben.

c) Der zeitliche Ablauf der Totenstarre wurde durch folgenden Versuch festgestellt (s. Versuchstabelle 6 a. S. 13 u. 14).

In diesem Versuche wurde einem Kaninchen eine große Muskelmenge entnommen und davon sieben Portionen von je 20 g abgewogen. Fünf solche Portionen wurden unter strenge Eiskühlung gestellt; eine davon sofort mit Salmiaklösung versetzt und weiter behandelt, die zweite erst nach drei Stunden mit Salmiaklösung zur Extraktion gebracht, die dritte nach sechs, die vierte nach neun, die fünfte nach 24 Stunden. — Eine weitere Portion wurde bei Zimmertemperatur sofort (in frischem Zustand) mit Salmiaklösung angesetzt, die letzte Portion wurde 24 Stunden unter Toluolzusatz stehen gelassen und dann erst die Extraktion begonnen.

Aus der Tabelle ersieht man, daß die beiden ersten Portionen annähernd die gleichen Extraktionswerte ergeben; in der dritten Portion ist bereits weniger lösliches Eiweiß, noch weniger in der vierten, am allerwenigsten in der fünften Portion enthalten; in dieser Portion überwiegen die unlöslichen Eiweißkörper bereits bedeutend die löslichen. Während die beiden ersten Portionen das chemische Bild des frischen Muskels zeigen, bietet die letztgenannte Portion das typische Bild des totenstarren Muskels. Zwischen diesen extremen Bildern finden wir die Übergänge vom frischen zum totenstarren Muskel. Der Beginn des Eintrittes der Totenstarre findet demnach (unter Eiskühlung) zwischen der dritten und sechsten Stunde post mortem statt. Nach neun Stunden hat der Prozeß der Starre eine ansehnliche Höhe, nach 24 Stunden — trotz Eiskühlung — anscheinend sein Maximum erreicht. Denn die in dieser letzten Portion gewonnenen Werte unterscheiden sich nicht wesentlich von den Werten der Portion, die bei Zimmertemperatur totenstarr geworden war. — Die Werte des „frischen“ Muskels, der bei Zimmertemperatur extrahiert wurde, entsprechen den oben angeführten.

d) Was die Frage der Lösung der Totenstarre anlangt, wurden zunächst zwei Versuche angestellt, in denen eine Muskelportion 48 Stunden unter Toluolzusatz stehen gelassen wurde. Während die Muskelpartikelchen auf der Höhe der Starre hart werden, fühlten sie sich um diese Zeit bereits wieder weich an, weswegen angenommen wurde, daß die Totenstarre bereits gelöst war; erst jetzt wurde die Extraktion mit Salmiak vorgenommen

Versuchstabelle 6.

Kaninchen 1500 g; je 20 g Muskulatur werden zu verschiedenen Zeiten teils unter Eiskühlung, teils unter Zimmertemperatur verarbeitet.

Beginn der Muskelverarbeitung post mortem		Unter Eiskühlung															
		Sofort				3 Stunden				6 Stunden				9 Stunden			
Tag und Stunde der Bestimmung	Der Muskelbrei wurde stehen gelassen	Myosin	Myogen	Gesamtes koag. Eiweiß	Stroma	Myosin	Myogen	Gesamtes koag. Eiweiß	Stroma	Myosin	Myogen	Gesamtes koag. Eiweiß	Stroma	Myosin	Myogen	Gesamtes koag. Eiweiß	Stroma
2. IV. 12 Uhr	3 Stunden	0,08	0,48	0,56	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3 „	3 „	0,20	0,88	1,08	—	0,16	1,14	1,30	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6 „	3 „	Spuren	0,50	0,50	—	0,16	0,78	0,94	—	Spuren	0,72	0,72	—	—	—	—	—
3. IV. 9 „	15 „	0,26	0,60	0,86	—	0,18	0,54	0,72	—	0,18	0,72	0,90	—	0,12	0,46	0,58	—
2 „	5 „	—	—	—	—	—	—	—	—	0,16	0,26	0,42	—	0,10	0,28	0,38	—
4. IV. 9 „	19 „	Spuren	0,42	0,42	—	Spuren	0,36	0,36	—	0,14	0,28	0,42	—	0,18	0,34	0,52	—
2 „	5 „	keines	0,10	0,10	—	keines	0,08	0,08	—	Spuren	0,12	0,12	—	Spuren	0,14	0,14	—
5. IV. 9 „	19 „	„	0,06	0,06	—	„	0,08	0,08	—	keines	0,07	0,07	—	keines	0,10	0,10	—
4 „	7 „	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	„	0,06	0,06	—
6. IV. 9 „	17 „	keines	Spuren		—	in Spuren			—	Spuren			—	„	Spuren		—
7. IV. 9 „	24 „	keines			0,50	keines			0,46	keines			1,44	„	keines		2,20
Je 20 g Muskulatur enthalten in Grammen:		0,54	3,04	3,58	0,50	0,50	2,98	3,48	0,46	0,48	2,17	2,65	1,44	0,40	1,38	1,78	2,20
Summe (in Prozenten des Gesamteiweißes) . . .		13,1	74,6	87,7	12,3	12,0	76,5	87,0	13,0	12,0	54,2	66,2	36,8	10,0	34,5	44,5	55,5

Versuchstabelle 6.

(Fortsetzung.)

Beginn der Muskelverarbeitung post mortem		Unter Eiskühlung				Bei Zimmertemperatur							
		24 Stunden				Sofort				24 Stunden			
Tag und Stunde der Bestimmung	Der Muskelbrei wurde stehen gelassen	Myosin	Myogen	Gesamtes koag. Eiweiß	Stroma	Myosin	Myogen	Gesamtes koag. Eiweiß	Stroma	Myosin	Myogen	Gesamtes koag. Eiweiß	Stroma
2. IV. 12 Uhr	3 Stunden	—	—	—	—	Spuren	0,50	0,50	—	—	—	—	—
3 „	3 „	—	—	—	—	0,26	0,39	0,65	—	—	—	—	—
6 „	3 „	—	—	—	—	0,10	0,40	0,50	—	—	—	—	—
3. IV. 9 „	15 „	—	—	—	—	0,14	0,34	0,48	—	—	—	—	—
2 „	5 „	0,20	0,28	0,48	—	—	—	—	—	0,26	0,40	0,66	—
4. IV. 9 „	19 „	0,10	0,26	0,36	—	Spuren	0,18	0,18	—	Spuren	0,20	0,20	—
2 „	5 „	Spuren	0,28	0,28	—	„	0,16	0,16	—	„	0,10	0,10	—
5. IV. 9 „	19 „	keines	0,06	0,06	—	keines	Spuren		—	keines	0,16	0,16	—
4 „	7 „	„	0,08	0,08	—	keines			—	„	Spuren		—
6. IV. 9 „	17 „	„	Spuren		—	„			—	„	keines		—
7. IV. 9 „	24 „	„	keines		2,90	„			1,45	—	—	—	2,87
Je 20 g Muskulatur enthalten in Grammen:		0,30	0,96	1,26	2,90	0,50	1,97	2,47	1,45	0,26	0,86	1,12	2,87
Summe (in Prozenten des Gesamteiweißes) . . .		7,5	24,0	31,5	68,5	13,0	50,1	63,1	36,9	6,5	22,0	28,5	71,5

und die erhaltenen Werte mit den aus dem frischen bzw. totenstarren Muskel gewonnenen Werten verglichen. — In einem dritten Versuche wurde dem eben getöteten Kaninchen eine größere Muskelportion entnommen, davon 20 g frisch, 20 g nach 24 Stunden extrahiert; ein Teil der Muskulatur wurde dem Tiere erst nach vollkommener Lösung der Starre entnommen (was an den Extremitäten nach 78 Stunden der Fall war) und auf ihre Eiweißzusammensetzung geprüft.

Versuchstabelle 7.

Gewicht des Kaninchens	Die Muskulatur wurde in Verarbeitung genommen	In Grammen			
		Myosin	Myogen	Gesamtes koag. Eiweiß	Stroma
2600 g	frisch[1])	0,80	2,95	3,75	1,73
	nach 24 Stunden	0,32	0,94	1,26	3,15
	nach 48 Stunden	0,10	1,29	1,39	2,94
2200 g	frisch[1])	0,94	2,52	3,36	1,80
	nach 48 Stunden	nicht bestimmt		1,85	3,09
1500 g	frisch[2])	0,60	2,50	3,10	0,80
	nach 24 Stunden	0,32	0,73	1,05	2,98
	nachdem die Muskeln keine Zeichen von Totenstarre mehr zeigten (nach 78 Stdn.)	0,18	0,82	1,00	3,00

Die Tabelle zeigt, daß sich die Eiweißzusammensetzung des Muskels von jener auf der Höhe der Starre kaum unterscheidet; daß autolytische Vorgänge mit Spaltung von Eiweißkörpern im abgestorbenen Muskel vor sich gehen, kann nach den im Laboratorium F. Müllers ausgeführten Untersuchungen Vogels[3]) sicherlich nicht bezweifelt werden und es liegt nahe, an einen Zusammenhang derartiger Vorgänge mit der Lösung der Totenstarre zu denken. Wir werden uns aber auf Grund der mitgeteilten Versuche davor hüten müssen, den Umfang dieser Eiweißverflüssigung zu überschätzen. Wir gelangen zur Erkenntnis, daß das durch die Totenstarre unlöslich gewordene Eiweiß auch bei Lösung der Starre seiner Hauptmasse nach unlöslich bleibt und nicht etwa wieder in lösliche Form übergeht.

---

[1]) Bei Zimmertemperatur.

[2]) Bei Eiskühlung.

[3]) R. Vogel, Untersuchungen über Muskelsaft. Deutsches Archiv für klin. Med. 1902, S. 292.

e) Die Totenstarre des quergestreiften Muskels geht demnach mit einer mächtigen Gerinnung des Plasmas einher, die auch nach Lösung der Starre bestehen bleibt. An dieser Gerinnung des Plasmas sind beide Eiweißkörper desselben, Myosin und Myogen, beteiligt; beide gehen zum großen Teil aus einer löslichen in eine unlösliche Modifikationen über; jedoch scheint das Myosin relativ etwas weniger an der Gerinnung beteiligt zu sein; dafür spricht die Zunahme des relativen Myosingehaltes in der Versuchsreihe der Tabelle 6; es ergeben sich für die einzelnen Portionen folgende Myosin- und Myogenwerte:

	In Grammen		In Prozenten des koagulierten Eiweißes	
	Myosin	Myogen	Myosin	Myogen
Unter Eiskühlung:				
frisch	0,54	3,04	15,0	85,0
nach 3 Stunden	0,50	2,98	14,8	85,2
„ 6 „	0,48	2,17	18,1	81,9
„ 9 „	0,40	1,38	22,4	77,6
„ 24 „	0,30	0,96	23,8	76,4
Bei Zimmertemperatur:				
frisch	0,50	1,97	20,5	79,5
nach 24 Stunden	0,26	0,86	23,5	76,5

Es zeigt sich also, daß die Myosinwerte im Verlaufe der sich entwickelnden Totenstarre absolut abnehmen, relativ etwas zunehmen: Auf der Höhe der Starre sind die relativen Myosinwerte am höchsten. — In Versuchstabelle 7 fand sich nach Lösung der Totenstarre der Myosinwert absolut und relativ geringer als auf der Höhe der Starre. Diese Verringerung des Myosingehaltes kann als eine weitere Gerinnung oder als eine Autolyse dieses Eiweißkörpers gedeutet werden. — Auch v. Fürth (l. c.) konstatierte in Muskeln, die längere Zeit liegen geblieben waren, ein fast völliges Schwinden des Myosins.

f) Die Totenstarre des Herzens tritt viel undeutlicher in Erscheinung als die des quergestreiften Muskels. Nach Beobachtungen am frischen Tierherzen findet ein „mäßiges Starrwerden“ des Muskels statt, das in seinem zeitlichen Auftreten der Starre des quergestreiften Muskels gleicht. — In den folgenden Versuchen wurden drei Herzen den betreffenden Tieren sofort post mortem entnommen; je 20 g Muskulatur aus der Wandung des

linken Ventrikels wurden in frischem Zustande (unter Eiskühlung) und 20 g nach 24 Stunden (bei Zimmertemperatur) untersucht.

Versuchstabelle 8.

Es enthalten je 20 g Herzmuskulatur:

Das Herz stammt vom	Frisch (unter Eiskühlung)							
	In Grammen				In Prozenten d. Gesamteiweißes			
	Myosin	Myogen	Gesamtes koag. Eiweiß	Stroma	Myosin	Myogen	Gesamtes koag. Eiweiß	Stroma
a) Rind . .	0,20	0,93	1,13	2,20	5,8	26,5	32,3	63,7
b) Hund .	0,22	1,05	1,27	2,05	6,6	31,7	38,3	61,7
c) Hund .	0,30	1,05	1,35	1,75	7,6	33,9	41,5	58,5
	Totenstarre (bei Zimmertemperatur)							
a) Rind . .	0,18	0,82	1,00	2,60	5,0	22,5	27,5	72,5
b) Hund .	0,16	0,91	1,07	2,30	4,8	27,0	31,8	68,2
c) Hund .	0,20	0,90	1,10	1,95	6,6	29,9	36,5	63,5

Der Unterschied in der Eiweißzusammensetzung des frischen und totenstarren Herzmuskels ist wesentlich geringer als beim quergestreiften Muskel. Versuchstabelle 8 zeigt bei dem nach 24 Stunden extrahierten Herzmuskel regelmäßig eine ganz geringfügige Abnahme des löslichen Eiweißes (4,7 bis 6,5 Proz.) und eine dementsprechende Zunahme der unlöslichen Eiweißkörper. Vergleicht man die Abnahme mit jener beim quergestreiften Muskel (über 50 Proz.), so läßt sich aus diesem Verhalten folgern, daß die Totenstarre des Herzmuskels mit einer Eiweißgerinnung von wesentlich geringerem Umfange einhergeht als die Starre des quergestreiften Muskels.

g) Keinen erkennbaren Einfluß der Totenstarre auf die Eiweißzusammensetzung findet man bei der glatten Muskulatur. Nasse gibt an, daß die Darmwand mehrere Stunden post mortem sich etwas härter anfühlte als unmittelbar nach dem Tode des Tieres. Er führt diese Erscheinung auf den Eintritt der Totenstarre in der Darmmuskulatur zurück. — Wir wählten den Uterus als Untersuchungsobjekt. Ein postmortales Starrerwerden des Organes war nicht zu beobachten. Im folgenden sind zwei

Versuche wiedergegeben, von denen der eine mit der Uterusmuskulatur eines Kalbes, der andere mit der einer Kuh angestellt wurde.

Je 20 g reinpräparierter Uterusmuskulatur wurden frisch und nach 24stündigem Stehen untersucht. Eine wesentliche Differenz der Eiweißzusammensetzung in den beiden Muskelportionen ließ sich nicht konstatieren.

Versuchstabelle 9.

Es enthalten je 20 g Uterusmuskulatur:

Der Uterus stammt von	Frisch (unter Eiskühlung)							
	In Grammen				In Prozenten d. Gesamteiweißes			
	Myosin	Myogen	Gesamtes koag. Eiweiß	Stroma	Myosin	Myogen	Gesamtes koag. Eiweiß	Stroma
a) Kuh (alt)	Spuren	1,20	1,20	2,54	—	32,0	32,0	68,0
b) Kalb . .	Spuren	1,10	1,10	2,88	—	28,2	28,2	71,9
	Totenstarre (bei Zimmertemperatur)							
a) Kuh (alt)	Spuren	1,10	1,10	2,60	—	29,7	29,7	70,3
b) Kalb . .	Spuren	1,20	1,20	3,02	—	28,3	28,3	71,3

Dieser Befund, verglichen mit jenem bei quergestreifter und Herzmuskulatur, führt uns zu der Annahme, *daß bei der glatten Muskulatur keine Totenstarre nachweisbar ist.*

Wir fassen daher die Ergebnisse dieses Kapitels dahin zusammen, daß sich in der quergestreiften Muskulatur eine mächtige postmortale Eiweißgerinnung, in der Herzmuskulatur eine mäßige, in der glatten keine namhafte Eiweißgerinnung vollzieht. Vergleichen wir den Plasmagehalt der drei Muskelgruppen (s. das folgende Kapitel), so finden wir, daß die Skelettmuskulatur an Plasma besonders reich ist, die Herzmuskulatur ärmer, die glatte Muskulatur am ärmsten. *Parallel diesem Plasmareichtum verläuft die postmortale Gerinnung im Muskel, die Totenstarre.* Je reicher der Muskel an löslicher Eiweißsubstanz ist, je mehr gerinnungsfähiges Material vorhanden ist, desto deutlicher tritt die Totenstarre in Erscheinung.

3. Eiweißzusammensetzung normaler Muskeln.

Nach den Versuchsergebnissen des vorigen Kapitels war die Möglichkeit gegeben, unter Einhaltung oben erwähnter Kautelen die postmortale Eiweißgerinnung im Muskel möglichst zu verhindern, um so ein Bild der Eiweißzusammensetzung des Muskels zu gewinnen, wie es — wenigstens annähernd — dem lebenden Muskel zukommen dürfte.

Daß es unmöglich ist, die postmortale Eiweißgerinnung des Muskels vollständig zu verhindern, wurde bereits oben erwähnt. Es ist durch die Versuchsanordnung nicht auszuschließen, daß ein, wenn auch geringer Bruchteil des Eiweißes gerinnt; ferner kommt auch die Verschiedenheit der Säurebildung im Muskel in Betracht, die eine Ungleichheit der Eiweißgerinnung bedingt; der Muskel mit größerer Säurebildung gerinnt rascher; diese Säurebildung hängt davon ab, ob sich der Muskel postmortal in Ruhe oder Arbeit befunden hat. Der arbeitende, bzw. tetanisierte Muskel zeigt die größere Säurebildung. Wir kommen noch im folgenden darauf zurück.

Mit diesen Einschränkungen können die in Versuchstabelle 10 (s. f. Seite) angeführten Werte dazu dienen, uns über die Eiweißzusammensetzung der verschiedenen Muskeltypen zu orientieren.

Entsprechend der morphologischen Einteilung der Muskulatur in glatte, quergestreifte und Herzmuskulatur ergeben die hier angeführten Eiweißwerte eine Gruppierung der Muskulatur nach ihrem Plasmagehalt: Die quergestreifte Muskulatur ist die plasmareichste, die glatte die stromareichste; zwischen beiden steht die Herzmuskulatur. Stellen wir die extremsten Fälle zusammen, so ergibt sich für:

	Plasma	Stroma
Quergestreifte Muskulatur	91,1	8,9
Herz	43,2	55,7
Glatte Muskulatur	28,1	71,9

Daß die Ungleichheit an Plasmagehalt mit der Ungleichheit der postmortalen Eiweißgerinnung und so mit der Totenstarre zusammenhängt, wurde bereits oben besprochen, und wir wenden uns nun der Besprechung der einzelnen Muskelarten zu:

Bei der Versuchsgruppe „Skelettmuskulatur" in Versuchstabelle 10 finden wir zunächst in den drei an Kaninchen angestellten Versuchen gut übereinstimmende Werte für Myosin, Myogen, Stroma und daher auch für den Gesamteiweißgehalt des Muskels. Die Werte zeigen in übereinstimmender Weise die

Versuchstabelle 10.

Je 20 g Muskulatur enthalten:

Art der Muskulatur	Der Muskel stammt von		Gesamt-Eiweißgehalt	In Grammen				In Prozenten des Gesamteiweißgehaltes			
				Myosin	Myogen	Gesamtes koag. Eiweiß (Muskelplasma)	Unlösliches Eiweiß (Stroma)	Myosin	Myogen	Gesamtes koag. Eiweiß (Muskelplasma)	Unlösliches Eiweiß (Muskelstroma)
Skelettmuskel	Kaninchen	1500 g	4,00	0,54	3,04	3,58	0,50	13,5	76,0	87,0	12,5
	Kaninchen	1500 g	4,00	0,50	2,98	3,48	0,46	12,0	74,5	88,5	11,5
	Kaninchen	1300 g	3,96	0,60	2,50	3,10	0,80	15,1	63,3	78,4	21,6
	Taube	Brustmuskel	4,50	0,70	3,40	4,10	0,40	15,6	75,5	91,1	8,9
	Taube	Schenkel	4,00	nicht wägbar	3,20	3,20	0,80	—	80,0	80,0	20,0
	Huhn	Brustmuskel	3,00	0,58	1,62	2,20	0,80	20,0	56,0	76,0	24,0
	Huhn	Schenkel	3,10	0,10	1,80	1,90	1,20	3,0	59,0	62,0	38,0
Herz	Rind	Herz	3,46	0,20	0,93	1,13	2,20	5,8	26,5	32,3	63,7
	Hund	„	3,35	0,22	1,05	1,27	2,05	6,6	31,7	38,3	61,7
	„	„	3,08	0,30	1,05	1,35	1,75	9,6	33,6	43,2	55,7
	Mensch	„	3,55	0,18	1,12	1,30	2,25	5,2	31,4	36,6	63,4
glatter Muskel	Kuh	Uterus	3,72	Spuren	1,20	1,20	2,54	—	32,0	32,0	68,0
	Kalb	„	4,10	„	1,10	1,10	2,88	—	28,1	28,1	71,9

oben schon zum Teil besprochenen Verhältnisse. Das Myosin beträgt 12 bis 15 Proz., das Myogen 63 bis 76 Proz., das Stroma 8,9 bis 21,6 Proz. des gesamten Eiweißgehaltes.

Der quergestreifte Muskel besteht demnach zum weitaus größten Teile aus löslichen Eiweißkörpern; der Rückstand unlöslicher Eiweißkörper (das „Stroma") beträgt in dem Versuche, der als der am besten gelungene zu bezeichnen ist, nur 8,9 Proz. Die mikroskopische Untersuchung dieses Rückstandes ergab, daß er Doppelbrechung, wenn auch in schwächerem Grade als der frische Muskel, zeigt. Die Muskelfibrillen sind erhalten, die Querstreifung jedoch verschwunden; nur an ganz vereinzelten Stellen erkennt man Reste derselben.

Danilewsky[1]) fand für die Oberschenkelmuskulatur ausgewachsener Kaninchen das Verhältnis von Plasma (Danilewsky nennt es Myosin) zu Stroma 1,0:0,83. Ferner zitiert er Beobachtungen von Cath. Schipiloff, die bei fünf jungen Kaninchen als Durchschnittswerte für Plasma zu Stroma = 1,00:1,23 ermittelte. Aus unserer Versuchsreihe hingegen folgt ein Mittelwert für das Verhältnis von Plasma zu Stroma = 1,00 : 0,18. Diese auffallende Verschiedenheit zwischen unseren und Danilewskys Werten erklärt sich in erster Linie daraus, daß Danilewsky die Totenstarre nicht berücksichtigt hat. Die zahlreichen Werte, die Danilewsky für quergestreifte Muskulatur angibt, entsprechen durchwegs jenen Zahlen, die wir für vollkommen oder partiell totenstarre Muskeln gefunden haben. — Die von Danilewsky für den Herzmuskel des Menschen ermittelten Werte (Plasma zu Stroma = 1 : 5,17) weichen ebenfalls von den unsrigen erheblich ab (Plasma zu Stroma = 1:2,60). Eine bessere Übereinstimmung ergab sich für die glatte Muskulatur. Danilewsky fand die Relation von Plasma zu Stroma = 1:1,94. Unsere Versuche ergeben ein Verhältnis 1:2,15.

Danilewsky hat auch angegeben (l. c. S. 147), „daß der größere relative Gehalt des Muskels an Gerüstsubstanz mit der größeren inneren Beweglichkeit der Muskeln Hand in Hand ginge". Danilewsky untersuchte die Brust- und Schenkelmuskeln von Taube, Huhn, Sperling, indem er von der Voraussetzung ausging, daß Vögel die Brustmuskeln in höherem Grade gebrauchten als die Schenkelmuskeln, erstere daher eine größere „Aktivität" be-

---

[1]) l. c.

säßen. — Eine Zusammenstellung der Werte Danilewskys mit den unsrigen ergibt:

		Plasma zu Stroma (Danilewsky)	Plasma zu Stroma (Verf.)
Huhn	Brustmuskel	1,0 : 3,05	1,0 : 0,10
	Schenkel	1,0 : 0,85	1,0 : 0,25
Taube	Brustmuskel	1,0 : 4,91	1,0 : 0,31
	Schenkel	1,0 : 1,22	1,0 : 0,61

Jene von Danilewsky gefundenen Unterschiede in den Eiweißwerten sind in unseren unter möglichster Vermeidung der postmortalen Eiweißgerinnung angestellten Versuchen nicht zu konstatieren. Es bestehen zwischen Brust- und Schenkelmuskulatur nur geringfügige Unterschiede und zwar in beiden untersuchten Fällen im umgekehrten Sinne, als es Danilewskys Angaben entsprechen würde. Die Schenkelmuskulatur ist scheinbar etwas reicher an „Stroma“ als die Brustmuskulatur. Wir möchten diese Differenz aber nicht so sehr auf den Unterschied der „inneren Beweglichkeit“ dieser Muskeln zurückführen, als vielmehr auf eine in beiden Fällen eingetretene partielle Eiweißgerinnung, die bei der Schenkelmuskulatur vermutlich einfach deswegen einen höheren Grad erreichte, weil die gefangenen Tiere kurze Zeit vor dem Tode lebhafte Bewegungen mit den Beinen ausgeführt hatten, und ihre Muskeln dadurch stärker sauer geworden waren. Jedenfalls aber zeigen die oben angeführten Werte, daß die Angaben Danilewskys über den Zusammenhang zwischen innerer Beweglichkeit und Stromagehalt durchaus unrichtig sind, und daß dieser Irrtum durch Verschiedenheiten im Eintritt der Totenstarre veranlaßt war.

Nebenbei möchten wir auf den relativ hohen Myosinwert in beiden Brustmuskeln, wie auf das vollständige Fehlen in den Schenkelmuskeln der Tauben hinweisen; hier liegt eine Differenz zwischen den beiden Muskelgruppen vor, die vielleicht im Sinne Steyrers[1]) gedeutet werden könnte.

Die am Herzen verschiedener Tierarten ausgeführten Versuche (s. Versuchstabelle 10) zeigen eine gute Übereinstimmung. Die Werte für Myosin, Myogen und Stroma bewegen sich annähernd in derselben Höhe. — Daß der Herzmuskel wesentlich plasmaärmer ist als der quergestreifte, wurde bereits oben erwähnt. Das Stroma überwiegt hier den Plasmagehalt. Das Verhältnis

---

[1]) l. c.

von Plasma zu Stroma ist im Durchschnitt 38 : 62 Proz. des Gesamteiweißgehaltes. Das Verhältnis von Myosin zu Myogen im Plasma entspricht ungefähr dem Verhältnis dieser Substanzen in der quergestreiften Muskulatur. — Der Gesamteiweißbestand des Herzens ist im Durchschnitt etwas geringer als der des quergestreiften.

Die Verhältnisse in der glatten Muskulatur stehen denen der Herzmuskulatur nahe: Nur ist der Plasmagehalt der glatten Muskulatur noch geringer. Myosin war in der glatten Muskulatur nur in Spuren nachzuweisen.

4. Eiweißzusammensetzung pathologisch veränderter Muskeln.

Der Einfluß pathologischer Veränderungen auf die Eiweißzusammensetzung des Herzmuskels wurde zunächst an einem durch Phosphorvergiftung zur fettigen Degeneration gebrachten Herzmuskel studiert:

Zwei Hunde wurden langsam durch Injektion von Phosphoröl zur Vergiftung gebracht und zwar erhielten sie durch drei Tage je 0,005 g Phosphor, dann durch drei weitere Tage je 0,01 g Phosphor. Der eine Hund starb am sechsten, der andere am siebenten Tage, beide unter den Erscheinungen der akuten Phosphorvergiftung. Leber, Niere und Herz zeigten hochgradige Verfettung. — Je 20 g Muskulatur des linken Ventrikels jedes Hundes wurden frisch und 20 g totenstarr untersucht.

Versuchstabelle 11.

Es enthalten je 20 g Herzmuskulatur:

Das Hundeherz war	Frisch (unter Eiskühlung)								
	In Grammen					In Proz. d. Gesamteiweißes			
	Gesamteiweißgehalt	Myosin	Myogen	Gesamtes koag. Eiweiß	Stroma	Myosin	Myogen	Gesamtes koag. Eiweiß	Stroma
a) Normal[1]	3,21	0,26	1,05	1,30	1,91	8,1	32,6	40,7	59,3
b) Verfettet (Phosphorherz)	2,98	0,34	1,18	1,52	1,46	11,4	39,8	51,2	48,8
c) Verfettet (Phosphorherz)	2,90	0,30	1,32	1,62	1,28	10,3	45,8	56,1	43,9

[1]) Durchschnittswerte aus Versuchstabelle 8.

Das Hundeherz war	Totenstarre (bei Zimmertemperatur)							
	In Grammen				In Proz. d. Gesamteiweißes			
	Myosin	Myogen	Gesamtes koag. Eiweiß	Stroma	Myosin	Myogen	Gesamtes koag. Eiweiß	Stroma
a) Normal[1] .	0,18	0,90	1,08	2,13	5,6	27,9	33,5	66,5
b) Verfettet (Phosphorherz)	0,28	0,95	1,13	1,83	9,5	31,9	41,4	59,6
c) Verfettet (Phosphorherz)	0,22	0,46	0,68	2,22	7,5	16,2	23,7	76,3

Die Eiweißzusammensetzung des durch Phosphorvergiftung zur Verfettung gebrachten Herzens zeigt eine Reihe von Unterschieden gegenüber dem normalen. Zunächst ist der Gesamteiweißgehalt des verfetteten Muskels etwas geringer als der des normalen; der Plasmagehalt des verfetteten Muskels ist erhöht und zwar kommt diese Plasmavermehrung hauptsächlich durch eine Vermehrung des Myogenbestandes im verfetteten Muskel zustande; doch auch der Myosingehalt hat zugenommen; die Menge des Stromas ist im verfetteten Muskel wesentlich geringer als im normalen; diese bedeutende Abnahme des Stromas bedingt trotz der Zunahme des Plasmas den geringeren Gesamteiweißbestand des verfetteten Muskels. — Da das Muskelplasma des verfetteten Herzens zugenommen, das Stroma abgenommen hat, ist das chemische Bild der Eiweißzusammensetzung des verfetteten Herzmuskels ein wesentlich anderes als das des normalen: Während im normalen Herzen der Stromagehalt größer ist als der Plasmabestand, überwiegt im verfetteten Herzen der Plasmagehalt den Stromabestand. Dieser Befund legt den Gedanken an eine Verwandlung von Stroma in Plasma nahe, ohne als ein ausreichender Beweis für eine solche gelten zu können.

Betrachtet man in obenstehender Versuchstabelle 11 die Werte für den verfetteten totenstarren Herzmuskel, so bemerkt man, daß in diesen Zahlen die Eiweißgerinnung viel mehr zum Ausdruck gelangt als beim normalen Herzmuskel. Es ist ein größerer Anteil des Plasmas gewonnen als beim normalen Herzen. Wie unter den

[1]) Durchschnittswerte aus Versuchstabelle 8.

drei Muskeltypen (quergestreifte, glatte und Herzmuskulatur) die plasmareichere Gruppe die größte postmortale Eiweißgerinnung zeigt, so gerinnt auch das Muskeleiweiß des durch die Erkrankung plasmareicher gewordenen Herzens stärker als dasjenige des normalen Herzens, derart, daß die Verschiebung der Eiweißzusammensetzung beim Eintritt der Totenstarre deutlicher in Erscheinung tritt.

Nach diesem Befunde war wenig Hoffnung vorhanden, an pathologischen Menschenherzen, die erst nach 24 bis 36 Stunden post mortem untersucht werden konnten, eventuelle, den vitalen Verhältnissen entsprechende Änderungen der Eiweißzusammensetzung gegenüber dem normalen Herzen zu konstatieren. Es müssen daher die in folgender Tabelle angeführten Werte mit großer Vorsicht gedeutet werden.

Versuchstabelle 12.

Je 20 g Muskulatur enthalten:

Pathologisch-anatomischer Befund des Herzens	In Grammen					In Proz. d. Gesamteiweißes			
	Gesamteiweißgehalt	Myosin	Myogen	Gesamtes koag. Eiweiß	Stroma	Myosin	Myogen	Gesamtes koag. Eiweiß	Stroma
Normal	3,55	0,18	1,12	1,30	2,25	5,2	31,4	36,6	63,4
	3,68	0,28	1,12	1,40	2,28	7,4	29,7	37,1	62,9
Braune Atrophie	3,08	—*	0,78	0,78	2,00	—	—	25,9	74,1
	3,05	—*	1,02	1,02	2,04	—	—	33,4	66,6
Fettige Degeneration	3,31	—*	1,06	1,06	2,25	—	—	31,9	68,1
	3,28	0,30	0,58	0,88	2,40	9,2	17,8	27,0	73,0
Hypertrophie	3,86	0,30	0,66	0,96	2,90	7,1	17,3	25,0	75,0
	3,79	0,28	0,79	1,07	2,72	6,9	21,3	28,2	71,8

Es sei zunächst bemerkt, daß in einigen Fällen Myosinbestimmungen nicht ausgeführt werden konnten. Es trat nämlich in diesen Versuchen wenige Minuten nachdem das Plasma vom Muskelbrei getrennt war eine bedeutende Spontangerinnung im Plasma auf, wie sie sonst nicht beobachtet wurde; diese machte die Myosinbestimmung unmöglich.

Der Gesamteiweißgehalt der drei untersuchten pathologischen Formen zeigt Abweichungen gegenüber dem normalen Herzen. Der atrophische Herzmuskel zeigt die größte Verminderung; ebenso ist der fettig degenerierte Herzmuskel eiweißärmer als der normale, wie wir es auch bei der durch Phosphorvergiftung erzeugten

Degeneration gesehen haben. — Der hypertrophische Herzmuskel hingegen ist eiweißreicher als der normale.

Die Eiweißzusammensetzung der drei pathologischen Formen zeigt Schwankungen, die innerhalb der Fehlergrenzen der Methode liegen. Den Befund Danilewskys, wonach das hypertrophische Herz stromaärmer ist als das normale, konnten wir in unseren Fällen nicht bestätigen. — Nochmals sei erwähnt, daß wir es hier mit totenstarrem Material zu tun hatten und daß die Totenstarre eventuelle Differenzen der Eiweißzusammensetzung, die intra vitam etwa bestanden haben, zu verwischen imstande ist.

Zusammenfassung.

1. Frühere Untersuchungen konnten kein richtiges Bild von der Eiweißzusammensetzung des Muskels geben, weil auf die Hintanhaltung der Totenstarre und auf die Wahl eines geeigneten Extraktionsmittels nicht ausreichend Gewicht gelegt worden war.
2. Werden die Muskeln unter Einhaltung der nötigen Kautelen untersucht, so zeigen sie entsprechend der morphologischen Einteilung in quergestreifte, glatte und Herzmuskulatur einen sehr verschiedenen Gehalt an löslichen und unlöslichen Eiweißkörpern (Muskelplasma und Muskelstroma). Der quergestreifte Muskel besteht zu etwa sieben Achteln seines Gesamteiweißbestandes, das Herz nur zu etwa einem Drittel, die glatte Muskulatur zu etwa einem Viertel aus Plasmaproteïden. — Von den letzteren entfallen etwa ein Fünftel auf Myosin, vier Fünftel auf Myogen.
3. Im Gegensatze zu den Angaben Danilewskys erwies sich die funktionelle Leistung der Muskulatur ohne Einfluß auf ihren Gehalt an Plasma und Stroma.
4. Pathologische Veränderungen des Herzmuskels bedingen Veränderungen in seiner Eiweißzusammensetzung. Der Gesamteiweißgehalt des verfetteten und des atrophischen Herzmuskels ist geringer, der des hypertrophischen größer als der des normalen. — In dem verfetteten Herzen phosphorvergifteter Hunde wurde eine Vermehrung der Plasma-, eine Verminderung der Stromaeiweißkörper festgestellt.
5. Der Prozeß der Totenstarre geht mit einer namhaften Eiweißgerinnung einher. Ein erheblicher Teil des löslichen Eiweißes verwandelt sich in unlösliches. Je mehr gerin-

nungsfähiges Material vorhanden ist, desto mächtiger ist diese Eiweißgerinnung und desto deutlicher tritt die Totenstarre in Erscheinung. Daher macht sich die Totenstarre im plasmareichen quergestreiften Muskel am meisten, im Herzmuskel viel weniger und in der glatten Muskulatur gar nicht geltend. In dem durch die Erkrankung plasmareicher gewordenen verfetteten Phosphorherzen ist sie wesentlich deutlicher als im normalen.

6. Die Eiweißgerinnung bei der Totenstarre ist irreversibel; auch nach Lösung der Starre bleibt die Hauptmenge der spontan geronnenen Muskelproteïde ungelöst.

Wien, Juli 1906.

II.

Über den Einfluß der Galle auf die fett- und eiweißspaltenden Fermente des Pankreas.

Von Privatdozent Dr. **Otto von Fürth,**
Assistent am k. k. physiologischen Institut der Universität zu Wien,

und Dr. **Julius Schütz,**
gew. poliklinischer Assistent.

Seitdem von Claude Bernard die Bedeutung des Zusammenwirkens von Galle und Pankreassaft für den normalen Ablauf des Verdauungsprozesses erkannt worden ist, haben zahlreiche Autoren auf dem Wege physiologisch-chemischer Untersuchung und klinischer Beobachtung die Frage aufzuklären gesucht, in welcher Weise die genannten beiden Sekrete einander in ihrer Arbeit ergänzen. Ein Überblick der Literatur lehrt jedoch, daß noch manche Probleme auf diesem Gebiete ihrer Lösung harren. Wir haben speziell zwei strittigen Teilfragen unsere Aufmerksamkeit zugewandt; einerseits der Feststellung, welchem Bestandteile der Galle der wiederholt beobachtete fördernde Einfluß derselben auf die Fettspaltung durch das Pankreassteapsin zugeschrieben werden muß, andererseits aber der Frage, ob man berechtigt ist, einen solchen Einfluß auch dem Trypsin gegenüber mit Sicherheit anzunehmen und ihm eine größere Bedeutung für den normalen Ablauf der Verdauungsvorgänge beizulegen.

1. Einfluß der Galle auf das Steapsin.

Die ersten Angaben über eine verstärkende Wirkung der Galle auf das Pankreassteapsin scheinen von Nencki[1]) herzu-

---

[1]) M. Nencki, Über die Spaltung der Säureester der Fettreihe und der aromatischen Verbindungen im Organismus und durch das Pankreas. Arch. f. exper. Pathol. und Pharmak. 20, 367 (1886).

rühren. Dieselben beziehen sich auf die Spaltung von Tribenzoin und Hammelfett durch Pankreasbrei mit und ohne Zusatz von Galle. Beim Hammeltalg wurde durch Gallenzusatz die Fettspaltung auf das Zweiundeinhalb- bis Dreifache gesteigert.

Weitere Beobachtungen hat Rachford[1]) angestellt. Im Anschlusse an Gads Versuche über Emulsionsbildung schätzte Rachford den Gehalt von Öl an freien Fettsäuren nach seinem Vermögen, mit Sodalösung Emulsionen zu bilden. Um über das fettspaltende Vermögen von Pankreassaft ein ungefähres Urteil zu gewinnen, brachte er diesen in einem kleinen Probierröhrchen mit neutralem Olivenöl auf eine bestimmte Temperatur, entnahm dann von Zeit zu Zeit mit einer Pipette Ölproben, brachte diese in ein Uhrglas mit Sodalösung und beobachtete die etwaige Emulsionsbildung. Sah er nun z. B., daß das Öl in einem Falle doppelt so schnell die Fähigkeit annahm, eine gute Emulsion zu bilden, als in einem anderen Falle, so zog er daraus den Schluß, der Pankreassaft habe hier doppelt so kräftig auf das Öl unter Fettsäureabspaltung eingewirkt. Rachford folgerte aus derartigen Beobachtungen, daß Galle an sich kein Fett zu spalten vermöge, daß sie aber (sowie im geringeren Grade auch das glykocholsaure Natron) befähigt sei, die fettspaltende Wirkung des Pankreassaftes zu erhöhen (und zwar Galle allein auf das dreiundeinhalbfache, glykocholsaures Natron auf das zweiundeinhalbfache, Galle bei Gegenwart von Salzsäure auf das vierfache).

Knauthe[2]) fand, daß die Galle des Karpfens in hohem Grade die Lipolyse durch Extrakte des Hepatopankreas dieses Fisches verstärkt. So wurden in einem Versuche ohne Galle 41 mg, mit Galle 342 mg Ölsäure aus Öl abgespalten; in einem anderen Versuche ohne Galle 17, mit Galle 81 mg.

Bruno[3]) entnahm mit Fleisch, Milch oder Brot gefütterten Hunden Pankreassaft und Galle und beobachtete die fettspaltende Wirkung des ersteren mit und ohne Zusatz von Galle, welche an sich nicht lipolytisch aktiv war.

---

[1]) B. K. Rachford, The influence of bile on the fat-splitting influence of pancreatic juice. Journ. of Physiol. 17, 72 (1891).

[2]) Knauthe, Über Verdauung und Stoffwechsel der Fische. Arch. f. Anat. u. Physiol. 18:)8, S. 149.

[3]) G. G. Bruno, La bile comme agent digestif (Travail du Laboratoire de Physiologie à l'Institut Impérial de Médicine expérimentale). Arch. des Sciences Biol. St. Petersbourg 7, 114—142 (1899).

1 ccm Pankreassaft; mit 1 ccm Mandelöl 1½ Stunden im Brutofen belassen, dann mit Barytwasser titriert (Phenolphtaleïn):

	Fleischnahrung	Milchnahrung	Brotnahrung
	0,78	0,97	1,15 ccm n/10 $Ba(OH)_2$
½ ccm Pankreassaft und ½ ccm Galle	2,2	3,08	2,08 ccm „

Gekochte Galle erwies sich etwas schwächer wirksam als ungekochte. Steigerung der Konzentration der Galle durch Eindampfen vermehrte die Wirksamkeit.

Glässner[1]) beobachtete den Einfluß von Galle und Darmsaft auf die Fettspaltung durch menschliches, einer Fistel entnommenes Pankreassekret:

Olivenöl 10 ccm und Pankreassaft 20 ccm; nach 24 Stunden gebildete Ölsäure in Prozenten	22 Proz.
dazu 10 ccm Galle	30 „
„ 10 ccm Darmpreßsaft	35 „
„ 10 ccm „ und 10 ccm Galle	40 „

Hewlett[2]) fand, daß die spaltende Wirkung des Hunde-Pankreassaftes (durch Sekretin oder die Kombination von Sekretin und Pilocarpin erhalten) in bezug auf Olivenöl, Äthylbutyrat, Äthyl- und Amylacetat, sowie Triacetin durch Zusatz von Galle gesteigert wird. Er beobachtete, daß die wirksame Substanz thermostabil ist, weder mit dem Cholesterin noch den Pigmenten noch den Kalksalzen der Galle identisch ist und glaubte, dieselbe im Lecithin gefunden zu haben. „Precisely the same accelerating effect may be produced by the addition of Lecithin to the pancreatic juice. Thus in one experiment the pure pancreatic juice by its action on Triacetin for 24 hours produced an acidity 4,3 ccm n/20. The same plus 2 ccm of bile produced 19,5 acidity and plus two drops of a strong alkoholic solution of Mercks Lecithin produced an acidity of 19,9. A commercial preparation of the bile salts will also accelerate the ester splitting of the pancreatic juice. But it seems, the more the bile salts are purified, the less effect they have in this respect, so that it is possible, that the action of the crude preparation is due to a contamination with lecithin.“ Der Autor vermutet, daß die Galle als Zymoexcitator wirkt, d. h. nicht

[1]) K. Glässner, Über menschliches Pankreassekret. Zeitschr. f. physiol. Chem. **40**, 470 (1904).

[2]) A. W. Hewlett, The effect of bile upon estersplitting action of pancreatic juice. (Physiol. Labor. of Cooper Med. College, San Francisco). John Hopkins Hospital, Bull. **16**, No. 166 (Jan. 1906).

sowohl durch Umwandlung eines Proferments in ein Ferment, als durch Verstärkung der Fermentwirkung als solcher.

Schließlich sei erwähnt, daß nach Babkin[1]) die Galle die Fähigkeit haben soll, eine „latente“ Form des Steapsins in einen aktiven Zustand überzuführen, und daß sie nach Garnier[2]) vermöge ihres Bilirubingehaltes angeblich imstande ist, eine gewisse spaltende Wirkung auf Monobutyrin auszuüben.

Wie aus den vorliegenden Angaben unzweifelhaft hervorgeht, ist demnach die Galle befähigt, die Spaltung des Fettes durch das Pankreassteapsin erheblich zu fördern. Die Frage jedoch, welchem Bestandteile der Galle diese charakteristische und für die physiologische Bedeutung der Galle sicherlich nicht unwesentliche Wirkung zukommt, erscheint noch unbeantwortet. Während die allerdings auf indirektem Wege gewonnenen, daher keineswegs eindeutigen Befunde Rachfords[3]) einen Hinweis auf die Wirksamkeit der gallensauren Salze enthalten, glaubt Hewlett[4]) dem Lecithin der Galle die wichtigste Rolle bei der Fettspaltung zuschreiben zu sollen.

Es ergab sich also für uns die Aufgabe, auf dem Wege systematischer Versuche die Frage zu beantworten, welchem ihrer Bestandteile die Galle ihre Fähigkeit verdankt, die Lipolyse durch Pankreassteapsin günstig zu beeinflussen.

A. Untersuchungsmethode.

Als geeignete Steapsinpräparate erwiesen sich uns Glycerinextrakte (6:250) aus dem von der chemischen Fabrik „Rhenania“[5]) in Aachen hergestellten „Pankreatin absolutum“. Dieses Fermentmaterial, das von H. Engel[6]) empfohlen und von ihm bei Ausführung seiner Untersuchungen über das Zeit- und Fermentgesetz des Pankreassteapsins benutzt worden ist, erwies sich auch uns als bequem und brauchbar.

---

[1]) Babkin, Verh. der Ges. russischer Ärzte, 23. Okt. 1903. Ref.: Biochem. Centralbl. 3, 257.

[2]) Garnier, Cause d’erreur pour l’évaluation du pouvoir lipasique dans les cas d’ictère. Compt. rend. Soc. de Biol. 55, 1180.

[3]) Rachford, l. c.

[4]) Hewlett, l. c.

[5]) Wir sind der chemischen Fabrik „Rhenania“ für die gefällige Beistellung von Pankreatin- und Kaseïnpräparaten für die Zwecke unserer Untersuchungen zu Danke verpflichtet.

[6]) Engel, Über das Zeit- und Fermentgesetz des Pankreassteapsins. Diese Beitr. 7, 77 (1905).

Um den von zahlreichen Autoren festgestellten begünstigenden Einfluß der Galle (bzw. der Gallenbestandteile) auf die Emulgierung der Fette auszuschalten, arbeiteten wir von vornherein stets mit homogenen Fettemulsionen. Wir stellten solche nach den in der sorgfältigen Arbeit von Kanitz[1]) erhaltenen Angaben her, indem wir käufliches Olivenöl mit der (titrimetrisch festgestellten) Menge n/10 Natronlauge versetzten, die eben erforderlich war, um alle in dem Öle enthaltenen Fettsäuren zu neutralisieren. Beim Umschütteln erhält man so eine sehr feinverteilte, dauerhafte und neutrale Emulsion.

Die Versuche wurden nun in der Regel derart ausgeführt, daß 20 ccm der Emulsion mit der Pipette abgemessen und in ein Erlenmeyerkölbchen übertragen wurden. Dann wurde eine abgemessene Menge der Steapsinlösung hinzugefügt. Um ein genaueres Abmessen der viskösen Glycerinlösung zu ermöglichen, versetzten wir dieselbe mit etwas Wasser (1 Teil Wasser zu 3 Teilen Glycerinextrakt). Nachdem das Kölbchen noch mit der zu prüfenden Flüssigkeit (Galle oder Lösung eines Gallenbestandteiles) beschickt worden war, wurde es in den Brutschrank gestellt.

Die Titration erfolgte mit n/10 Natronlauge unter Anwendung von Phenolphthaleïn. Zur Umgehung der Hydrolyse und der durch diese bedingten Titrationsfehler wurden, Kanitz'[2]) Angaben entsprechend, vor der Titration 50 ccm Alkohol von 95 Proz. hinzugefügt.

Es wurden immer Parallelbestimmungen ausgeführt. Alle mitgeteilten Titrationswerte sind als Mittelwerte aus zwei gesondert angesetzten und gleichmäßig behandelten Einzelversuchen anzusehen.

Wir gehen nunmehr zur Mitteilung unserer Versuche über:

B. Versuche mit Gallen verschiedener Herkunft.

Versuch 1. Rindergalle. Je 20 ccm Ölemulsion; dazu a) 2 ccm Steapsinlösung; b) 2 ccm Steapsin und 5 ccm Galle; c) ohne Zusatz. Titration nach 6 Stunden bei 37°: a) 8,7, b) 26,2, c) 3,0 ccm n/10 HCl.

Versuch 2. Schweins- und Hundegalle. Je 20 ccm Ölemulsion; dazu a) 10 ccm Steapsin; b) 10 ccm Steapsin und 5 ccm Schweinsgalle;

---

[1]) Kanitz, Über Pankreassteapsin und über die Reaktionsgeschwindigkeit der mittels Enzyme bewirkten Fettspaltung. Zeitschr. f. physiol. Chem. **46**, 482 (1905).

[2]) A. Kanitz, Beiträge zur Titration hochmolekularer Fettsäuren. Ber. d. deutsch. chem. Ges. **6**, 400 (1906).

c) 10 ccm Steapsin und 5 ccm Hundegalle; d) 5 ccm Schweinsgalle. Titration nach 5 Stunden bei 38°: a) 2,9, b) 27,6, c) 41,7, d) 2,0 ccm n/10 HCl.

Versuch 3. Jungschweinsgalle. Je 10 ccm Ölemulsion; dazu a) 2 ccm Steapsin; b) 2 ccm Steapsin und 2 ccm Galle. Titration nach 7 Stunden bei 37°: a) 10,0, b) 19,0 ccm n/10 HCl.

Diese Versuche ergaben demnach, übereinstimmend mit den Resultaten früherer Autoren, eine Vervielfachung der Steapsinwirkung durch Gallenzusatz. Auch zeigten sie, daß die Wirkung keinesfalls artspezifisch ist, da Steapsin gleicher Herkunft in derselben Weise durch Rinder-, Schweine- und Hundegalle in seiner Wirkung verstärkt wurde.

C. Fraktionierungsversuche.

Versuch 4. Rohe und gekochte Galle. Je 20 ccm Ölemulsion; dazu a) 10 ccm Steapsin; b) 10 ccm Steapsin und 5 ccm Schweinsgalle; c) 10 ccm Steapsin und 5 ccm Schweinsgalle, gekocht; d) 5 ccm Schweinsgalle, roh; e) 5 ccm Schweinsgalle, gekocht; f) kein Zusatz. Titration nach 16 Stunden bei 32°: a) 15,0, b) 50,2, c) 40,3, d) 2,6, e) 2,8, f) 2,0 ccm n/10 HCl.

Versuch 5. Alkoholfällung von Schweinsgalle. 50 ccm Schweinsgalle wurden mit dem sechsfachen Volumen 95 proz. Alkohol gefällt. Nach 24 Stunden wurde der Niederschlag abfiltriert, mit Alkohol gewaschen, mit 50 ccm Wasser geschüttelt, das Ungelöste abfiltriert (alkoholfällbare Fraktion). Das Filtrat der Alkoholfällung wurde am Wasserbade eingedunstet und der Rückstand in 50 ccm Wasser gelöst (alkohollösliche Fraktion). Je 20 ccm Ölemulsion; dazu a) 10 ccm Steapsin; b) 10 ccm Steapsin und 5 ccm Schweinegalle; c) 10 ccm Steapsin und 5 ccm alkohollösliche Fraktion; d) 10 ccm Steapsin und 5 ccm alkoholfällbare Fraktion; e) kein Zusatz. Titration nach 4 Stunden bei 35°: a) 6,0, b) 30,2, c) 32,0, d) 2,8, e) 1,5 ccm n/10 HCl.

Versuch 6. Alkoholfällung von Rindergalle. Analoger Vorgang wie in Versuch 5. Je 20 ccm Ölemulsion; dazu a) 2 ccm Steapsin; b) 2 ccm Steapsin und 5 ccm alkohollösliche Fraktion; c) 2 ccm Steapsin und 5 ccm alkoholfällbare Fraktion; d) kein Zusatz. Titration nach 6 Stunden bei 28°: a) 3,0, b) 16,2, c) 2,8, d) 1,4 ccm n/10 HCl.

Versuch 7. Gallenasche. 12 ccm der Schweinsgalle von Versuch 5 wurden im Platintiegel verascht, die Asche in Wasser unter Zusatz von einigen Tropfen verdünnter Salzsäure gelöst, die Lösung mit Natronlauge genau neutralisiert und durch Wasserzusatz auf 12 ccm gebracht. Je 10 ccm Ölemulsion; dazu a) 2 ccm Steapsin; b) 2 ccm Steapsin und 4 ccm Gallenaschenlösung. Titration nach einigen Stunden bei 37°: a) 7,1, b) 8,2 ccm n/10 HCl.

Versuch 8. Lecithin. 200 ccm Rindergalle wurden wiederholt mit Äther ausgeschüttelt. Der Äther wurde eingedunstet und der spärliche fettige Rückstand in 5 ccm Alkohol gelöst. (Lecithinfraktion.) Je 20 ccm Ölemulsion; dazu a) 5 ccm Steapsin; b) 5 ccm Steapsin und 10 ccm der mit Äther extrahierten Galle; c) 5 ccm Steapsin und 0,5 ccm der Lecithinfraktion

entsprechend 20 ccm Galle. Titration nach $4^1/_2$ Stunden bei 38°: a) 7,2, b) 28,0, c) 6,8 ccm n/10 HCl.

Versuch 8 a. Je 20 ccm Ölemulsion und 2 ccm Steapsin; dazu a) kein Zusatz; b) 10 ccm Galle mit Äther extrahiert und achtfach mit Wasser verdünnt; c) 1 ccm der alkoholischen Lecithinlösung vom vorigen Versuche, Titration nach $5^1/_2$ Stunden bei 39°: a) 5,1, b) 10,8, c) 5,5 ccm n/10 HCl.

Aus diesen Versuchen ersieht man die Irrigkeit der Annahme von Hewlett[1]), der die Wirksamkeit der Galle auf ihren Lecithingehalt zurückführen wollte; einerseits erwies sich die Lecithinfraktion tatsächlich ganz unwirksam, während andererseits die Galle trotz Extraktion des Lecithins mit Äther ihre volle Wirksamkeit behalten hatte und noch befähigt war (Versuch 8) die fettspaltende Kraft des Steapsins auf das Vierfache zu erhöhen. Dabei ist zu beobachten, daß in dem Versuche 8 a die als wirksam erkannte Galle einem Quantum von nur 1,3 ccm, die unwirksame Lecithinfraktion aber einem Quantum von 40 ccm der unverdünnten Galle entsprach. Wir kommen auf Hewletts Beobachtung noch später zurück.

Es ergibt sich ferner, daß die Wirksamkeit der Galle weder auf einen ihrer Mineralbestandteile noch auf ein durch Kochhitze zerstörbares Ferment bezogen werden kann und daß der wirksame, thermostabile Bestandteil durch Alkohol nicht gefällt wird.

D. Versuche mit Platnerscher Galle und glykocholsaurem Natron.

Versuch 9. Platnersche Galle. Aus 300 ccm Rindergalle wurde nach dem bekannten Vorgange ein farbloses Präparat von sogenannter Platnerscher Galle, i. e. einem Gemenge von gallensauren Salzen hergestellt und in 200 ccm Wasser unter Zusatz von einer Spur n/10 Natronlauge gelöst. 5 ccm dieser Lösung erforderten zur Neutralisation gegen Phenolphtaleïn einen Zusatz von 1 ccm n/10 HCl. Je 20 ccm Ölemulsion; dazu a) 2 ccm Steapsin; b) 2 ccm Steapsin und 5 ccm der Lösung von Platnerscher Galle. Titration nach 5 Stunden bei 34°: a) 5,6, b) 30,2 ccm n/10 HCl.

Versuch 10. Platnersche Galle. Um den Einfluß von geringen Aciditätsänderungen auf den Reaktionsverlauf festzustellen, wurde der vorige Versuch mit Kontrollproben unter Zusatz von n/10 NaOH und n/10 HCl wiederholt. Je 25 ccm Ölemulsion; dazu a) 1 ccm Steapsin; b) 1 ccm Steapsin und 1,5 ccm n/10 NaOH; c) 10 ccm Steapsin und 2 ccm n/10 HCl; d) 1 ccm Steapsin und 5 ccm der Lösung von Platnerscher Galle. Titration nach 3 Stunden im Brutschrank: a) 0,6, b) 2,6, c) 2,8, d) 8,6 ccm n/10 HCl.

Versuch 11. Glykocholsaures Natron. Aus Platnerscher Galle wurde auf dem Wege über das Bleisalz ein Präparat von reinem glykochol-

[1]) l. c.

saurem Natron gewonnen [1]). 0,52 g davon wurden in einem Gemenge von 15 ccm n/10 NaOH und 25 ccm Wasser gelöst. Die Lösung reagierte gegen Phenolphtaleïn sauer, gegen Lackmus schwach alkalisch. Je 20 ccm Ölemulsion; dazu a) 5 ccm Steapsin; b) 5 ccm Steapsin und 5 ccm Glykocholatlösung; c) 5 ccm Steapsin und 2,5 ccm Glykocholatlösung. Titration nach $5^1/_2$ Stunden bei 38°: a) 7,8, b) 23,6, c) 13,7 ccm n/10 HCl.

Versuch 12. Glykocholsaures Natron nach Bleibtreu. Um eine Trübung der Versuchsresultate durch eine etwaige, chemisch nicht nachweisbare Verunreinigung der gallensauren Salze durch eine ihnen hartnäckig anhaftende Substanz auszuschließen, wurde ein anderes Präparat von glykocholsaurem Natron nach einem von dem früheren gänzlich abweichenden Verfahren und zwar dem von Bleibtreu dargestellt. Dasselbe beruht darauf, daß nach vorausgegangener Fällung der Galle mit Uranacetat die Glykocholsäure mit Eisenchlorid niedergeschlagen, das Eisensalz mit Ammoniak zerlegt, die Glykolsäure sodann als Uransalz neuerlich gefällt und nach Zerlegung der letzteren mit Natriumphosphat neuerlich durch Salzsäure und Äther abgeschieden wird.

Je 20 ccm Ölemulsion wurden versetzt a) mit 5 ccm Steapsin, b) mit 5 ccm Steapsin und 10 ccm 0,25 proz. wässeriger Natriumglykocholatlösung; c) mit 10 ccm der Glykocholatlösung. Titration nach 6 Stunden bei 40°: a) 12,8, b) 35,8, c) 1,9 ccm n/10 HCl.

Da es undenkbar scheint, daß irgend eine zufällige Verunreinigung der Platnerschen Galle dem daraus gewonnenen glykocholsauren Natron und dem nach einem gänzlich abweichenden und komplizierten Verfahren gewonnenen Bleibtreuschen Präparate gleichmäßig anhafte und sich überdies noch ein drittes, uns von Herrn Prof. Pregl in Graz gütigst überlassenes sehr reines Glykocholsäurepräparat (aus Tübinger Galle bereitet) in gleicher Weise wirksam erwies, halten wir uns für berechtigt, die in Rede stehende charakteristische Wirkung der Galle den gallensauren Salzen zuzuschreiben.

Da die Wirkung auch der Hundegalle zukommt, diese aber im wesentlichen nicht Glyko-, sondern Taurocholsäure enthält, so ist offenbar auch diese letztere befähigt, die Wirkung des Steapsins zu verstärken.

E. Versuche mit cholsaurem Natron.

Die mitgeteilten Beobachtungen machten es von vornherein wahrscheinlich, daß die Wirksamkeit der Gallensäuren der sowohl der Glyko- als auch der Taurocholsäure gemeinsamen Cholsäurekomponente zuzuschreiben sei. Wir stellten daher Versuche mit cholsauren Salzen an.

[1]) Die letztgenannten Präparate wurden von Herrn cand. med. Jerusalem dargestellt und uns freundlichst überlassen.

Versuch 13. Wir bedienten uns zunächst eines von der chemischen Fabrik Th. Schuchardt in Görlitz bezogenen Cholsäurepräparates. 1 g davon wurde in einem Gemenge von 30 ccm n/10 NaOH und 70 ccm Wasser gelöst. Die Lösung reagierte sauer gegen Phenolphtaleïn und schwach alkalisch gegen Lackmus. Je 20 ccm Ölemulsion; dazu a) 5 ccm Steapsin; b) 5 ccm Steapsin und 10 ccm Natriumcholatlösung von 1 Proz.; c) 10 ccm Natriumcholatlösung von 1 Proz. Titration nach 4 Stunden bei 38°: a) 8,3 b) 30,8, c) 1,9 ccm n/10 HCl.

Versuch 14. Je 10 ccm Ölemulsion; dazu a) $2^1/_2$ ccm Steapsin; b) $2^1/_2$ ccm Steapsin und 5 ccm Natriumcholatlösung von 1 Proz.; c) 5 ccm Natriumcholatlösung von 1 Proz. Titration nach 6 Stunden bei 38°: a) 4,3, b) 11,4, c) 2,3 ccm n/10 HCl.

Versuch 15. Je 20 ccm Ölemulsion; dazu a) 5 ccm Steapsin, b) 5 ccm Steapsin und 10 ccm Natriumcholatlösung von 1 Proz.; c) 10 ccm Natriumcholatlösung von 1 Proz. Titration nach 6 Stunden bei 38°: a) 19,0, b) 72,0, c) 4,0 ccm n/10 HCl.

Dank der besonderen Liebenswürdigkeit des Herrn Professors Pregl stand uns für weitere Versuche ein von ihm dargestelltes, außerordentlich reines, viermal umkristallisiertes Cholsäurepräparat zur Verfügung. Dasselbe gelangte in 1 proz. Lösung zur Anwendung. Diese wurde teils in der Weise hergestellt, daß wir 1 g des Präparates in heißem Alkohol lösten, die Lösung mit ein wenig mehr als der auf ein Carboxyl pro Molekül berechneten Menge (16,5 ccm) $^1/_{10}$ Normal-Natronlauge versetzten, durch Eindampfen vom Alkohol befreiten und mit Wasser auf 100 ccm auffüllten; teils aber in der Weise, daß wir 1 g in feingepulvertem Zustande in einem Gemenge von 25 ccm n/20 NaOH und 70 ccm H_2O durch Schütteln und Erwärmen lösten. (Vgl. unten Kontrollversuche über Einfluß des Alkaleszenzgrades).

Versuch 16. Je 20 ccm Ölemulsion; dazu a) 5 ccm Steapsin; b) 5 ccm Steapsin und 10 ccm 1 proz. Natriumcholatlösung. Titration nach $5^1/_2$ Stunden bei 36°: a) 24,6, b) 44,9 ccm n/10 HCl.

Versuch 17. Je 20 ccm Ölemulsion; dazu a) 5 ccm Steapsin; b) 5 ccm Steapsin und 10 ccm 1 proz. Natriumcholatlösung; c) 5 ccm Steapsin und 1 ccm 1 proz. Natriumcholatlösung; d) 5 ccm Steapsin und 0,1 ccm 1 proz. Natriumcholatlösung. Titration nach 5 Stunden bei 36°: a) 5,0, b) 31,5, c) 8,0, d) 4,6 ccm n/10 HCl.

Versuch 18. Je 20 ccm Ölemulsion und 5 ccm Steapsin; dazu a) 5 ccm, b) 1 ccm, c) 0,5 ccm 1 proz. Natriumcholatlösung; d) kein Zusatz. Titration nach 6 Stunden im Brutschrank: a) 44,6, b) 45,2, c) 42,0, d) 7,2 ccm n/10 HCl.

Auch dieses Cholsäurepräparat erwies sich demnach hochgradig wirksam. Unter günstigen Versuchsbedingungen (und solche waren im Versuch 18 vorhanden) hatten 0,5 ccm einer 1 proz. Lösung, entsprechend einer Menge von 0,005, sich befähigt erwiesen, das fettspaltende Vermögen des Steapsins auf das Sechsfache zu erhöhen.

Da bei der Anstellung verschiedener Versuche geringe Differenzen im Säuregrade der Emulsion und Cholatlösung unvermeidlich waren, wurde eine Versuchsreihe ausgeführt, um den Einfluß der Alkaleszenz auf den Verlauf der Reaktion klarzulegen.

Versuch 19. Zusatz von Natronlauge. Je 20 ccm Ölemulsion und 5 ccm Steapsin; dazu a) kein Zusatz; b) 10 ccm 1 proz. Natriumcholatlösung; c) 0,2 ccm n/10 NaOH; d) 1 ccm n/10 NaOH; Titration nach 6 Stunden bei 35°: a) 12,9, b) 67,8, c) 11,0, d) 9,9 ccm n/10 HCl.

Versuch 20. Zusatz von Natronlauge. Je 20 ccm Ölemulsion und 5 ccm Steapsin dazu a) 10 ccm 1 proz. Natriumcholatlösung; b) 1 ccm n/10 NaOH; c) 3 ccm n/10 NaOH; d) 5 ccm n/10 NaOH. Titration nach 5 Stunden bei 36°: a) 61,6, b) 20,9, c) 10,9, d) 11,4 ccm n/10 NaOH.

Versuch 21. Zusatz von Natronlauge. Je 20 ccm Ölemulsion und 2,5 ccm Steapsin; dazu a) kein Zusatz; b) 0,5 ccm n/10 NaOH; c) 1 ccm n/10 NaOH; d) 5 ccm n/10 NaOH. Titration nach $5^1/_2$ Stunden bei 38°: a) 5,0, b) 3,5, c) 3,2 ccm n/10 HCl, d) 1,0 ccm n/10 NaOH.

Versuch 22. Zusatz von Salzsäure. Je 20 ccm Ölemulsion und 5 ccm Steapsin; dazu a) kein Zusatz; b) 10 ccm 1 proz. Natriumcholatlösung; c) 1,5 ccm n/10 HCl. Titration nach 6 Stunden bei 36°: a) 12,5, b) 31,0, c) 6,7 ccm n/10 HCl.

Versuch 23. Ölsäurezusatz. Je 20 ccm Ölemulsion; dazu a) 5 ccm Steapsin; b) 5 ccm Steapsin und 0,1 ccm Ölsäure (Acidität gegen Phenolphtaleïn = 3,0 ccm n/10 HCl); c) 5 ccm Steapsin und 0,4 ccm Ölsäure (Acidität = 12 ccm n/10 HCl); d) 0,4 ccm Ölsäure. Titration nach 6 Stunden bei 38°: a) 31,8, b) 34,7, c) 45,8, d) 12,5 ccm n/10 HCl.

Aus den mitgeteilten Versuchen geht hervor, daß stärkere Zusätze von Säure oder Alkali eine gewisse Hemmung der Steapsinwirkung gegenüber bewirken können, daß Alkaleszenzänderungen aber nicht etwa imstande sind, die gewaltige Steigerung der Fettspaltung in den Cholsäureversuchen irgendwie zu erklären.

Schließlich noch ein Kontrollversuch mit frischer Ochsengalle zur Beantwortung der Frage, ob denn der Cholsäuregehalt der Galle genügt, um ihre Wirkung auf das Steapsin ausreichend zu erklären. Die Galle wurde ihrem Cholatgehalt entsprechend (etwa 8 Proz.) verdünnt.

Versuch 24. Je 20 ccm Ölemulsion; dazu a) 10 ccm Wasser; b) 5 ccm Steapsin und 10 ccm Wasser; c) 5 ccm Steapsin und 10 ccm Natriumcholat 1 Proz.; d) 5 ccm Steapsin und 10 ccm Ochsengalle (mit Wasser siebenfach verdünnt). Die Acidität der Cholatlösung betrug 0,3 ccm. Diejenige der Galle 0,9 ccm n/10 HCl für 10 ccm (gegen Phenolphtaleïn). Titration nach 5 Stunden bei 39°: a) 1,7, b) 11,1, c) 47,0, d) 48,1 ccm n/10 HCl.

Sowohl das Cholat als auch die ihrem Cholatgehalt entsprechend verdünnte Galle hatten die Steapsinwirkung auf mehr als das Vierfache verstärkt.

F. Verschiedenheiten im Verhalten von Steapsinlösungen.

Wir machten gelegentlich die Beobachtung, daß Steapsinlösungen, aus demselben Pankreatinpräparat durch Glycerinextraktion gewonnen, große Verschiedenheiten in ihrem Verhalten gegen ein und dieselbe Cholatlösung zeigen können, insofern sich die einen nur schwach, die anderen sehr stark „aktivierbar“ erwiesen:

Versuch 25: Je 20 ccm Ölemulsion und 5 ccm Steapsinlösung; dazu a) kein Zusatz; b) 10 ccm Natriumcholatlösung von 1 Proz. (dieselbe Lösung, welche bei einigen der vorerwähnten Versuche als hochwirksam erscheint). Titration nach 6 Stunden im Brutschrank: a) 8,5, 8,2, 9,7, b) 10,8, 11,5, 15,7 ccm n/10 HCl.

Zur Feststellung ob Verschiedenheiten in der Art der Extraktion der Pankreatinpräparate mit Glycerin diese Unterschiede erklären können, stellten wir Versuche mit fraktionierter Extraktion an, indem dieselbe Pankreatinmenge mehrere Male hintereinander mit Glycerin ausgezogen wurde:

Versuch 26. Je 20 ccm Ölemulsion und 5 ccm Steapsin (Glycerinextrakt); dazu a) kein Zusatz; b) 10 ccm Natriumcholatlösung von 1 Proz.:

1.	Glycerinextrakt	a) 41,5	b) 43,0 ccm n/10 HCl
2.	„	a) 16,0	b) 17,7 „ „
3.	„	a) 10,6	b) 18,5 „ „

Versuch 27. Je 20 ccm Ölemulsion und 5 ccm Steapsin (Glycerinextrakt); dazu a) kein Zusatz; b) 10 ccm Natriumcholatlösung von 1 Proz.; c) 10 ccm Natriumglykocholatlösung von 1 Proz.; d) 10 ccm Galle (Verdünnung 1 Teil Galle zu 9 Teilen Wasser). Titration nach etwa 4 Stunden im Brutofen:

1.	Glycerinextrakt	a) 55,5	b) 63,0	c) 61,5	d) 62,0
2.	„	a) 13,1	b) 18,5	c) 15,5	d) 22,2
3.	„	a) 8,9	b) 19,8	c) 21,3	d) 23,4

Wir sehen in beiden Versuchen, daß die beiden ersten Glycerinextrakte nur wenig „aktivierbar“ waren, während das dritte an sich viel schwächer wirksame Extrakt durch Zusatz von Cholat (bzw. Glykocholat und Galle) in seiner Wirkung verdoppelt wurde.

Bei einem dritten Versuche erwies sich bereits der erste Glycerinextrakt (in gleicher Weise aus demselben Pankreatinpräparat gewonnen) durch Cholatlösung stark aktivierbar.

Wir beabsichtigen diese Verhältnisse, für die wir noch keine ausreichende Erklärung zu geben vermögen, eingehender zu studieren.

G. Versuche mit Cholsäurederivaten.

Dank dem gütigen Entgegenkommen des Herrn Prof. Pregl in Graz, der so liebenswürdig war, uns eine Reihe von ihm in reinster Form angefertigter Cholsäurederivate zur Verfügung zu stellen, waren wir in der Lage, unsere Versuche auf folgende, der Cholsäure nahestehende Substanzen auszudehnen.

1. Desoxycholsäure, $C_{24}H_{40}O_4$, von Pregl[1]) aus den sogen. nicht kristallisierenden Mutterlaugen der Cholsäure rein dargestellt; mit der Choleïnsäure Latschinoffs identisch oder ihr isomer. 2. Cholansäure, $C_{24}H_{36}O_7$, von Pregl[2]) durch Oxydation der Desoxycholsäure erhalten. 3. Biliansäure, $C_{24}H_{34}O_8$, und endlich ein weiteres Oxydationsprodukt: 4. Ciliansäure, der nach Pregls[2]) Feststellung die Formel $C_{20}H_{28}O_8$ zukommt. Die Säuren wurden in ihre Na-Salze übergeführt.

Versuch 28. Je 20 ccm Ölemulsion und 5 ccm Steapsin; dazu a) 10 ccm Wasser; b) 10 ccm cholsaures Natron; c) 10 ccm desoxycholsaures Natron; d) 10 ccm cholansaures Natron; e) 10 ccm biliansaures Natron; f) 10 ccm ciliansaures Natron. Titration nach 5 Stunden bei 39°: a) 17,3, b) 54,3, c) 58,7, d) 25,0, e) 19,7, f) 19,0 ccm n/10 HCl.

Versuch 29. Wiederholung des vorigen Versuches, jedoch mit 3 ccm Steapsinlösung. Titration nach $5^1/_2$ Stunden bei 39°: a) 6,3, b) 33,7, c) 23,9, d) 6,0, e) 1,9, f) 7,3 ccm n/10 HCl.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß die Desoxycholsäure, welche als Begleiterin der Cholsäure in der Galle auftritt, annähernd dieselbe Wirksamkeit dem Steapsin gegenüber entfaltet, wie die Cholsäure selbst. Dagegen erwiesen sich die Oxydationsprodukte der beiden genannten Säuren, die Cholan-, Bilian- und Ciliansäure als durchwegs unwirksam.

H. Schlußfolgerungen.

Ein Blick auf die vorliegenden Versuchsreihen sowie insbesondere der Vergleich von Glykocholsäure, Cholsäure und der ihrem Cholatgehalt entsprechend verdünnten Galle lehrt, daß die Wirksamkeit der Galle dem Steapsin gegenüber jedenfalls der Hauptsache nach durch ihren Gehalt an gallen-

---

[1]) Fritz Pregl, Über Isolierung von Desoxycholsäure und Cholalsäure aus frischer Rindergalle und über Oxydationsprodukte dieser Säuren. (Aus den Sitzungsberichten der Kaiserl. Akad. der Wissenschaften in Wien, Math.-naturw. Klasse 61, Abt. II b, Oktober 1902.

[2]) l. c.

sauren Salzen und zwar durch die Cholsäurekomponente derselben bedingt ist.

Daß das Lecithin nicht, wie Hewlett meinte, die wichtigste Rolle bei der Aktivierung des Pankreassteapsins spielen kann, ergibt sich schon aus dem Umstande, daß die mit Äther extrahierte Galle an Wirksamkeit anscheinend nichts eingebüßt hat und daß sich andererseits das lecithinhaltige Ätherextrakt aus Galle unwirksam erwies.

Wenn wir also Hewletts Schlußfolgerungen auch keineswegs beizupflichten vermögen, so können wir doch die Richtigkeit seiner Beobachtung bestätigen, derzufolge die Steapsinwirkung durch Zusatz einer konzentrierten alkoholischen Lecithinlösung erheblich verstärkt werden kann.

Versuch 30. Je 20 ccm Ölemulsion und 5 ccm Steapsin; dazu a) 5 ccm Wasser; b) 5 ccm Galle und $^1/_2$ ccm 95 proz. Alkohol; c) 5 ccm Galle und 2 ccm 95 proz. Alkohol; d) $^1/_2$ ccm 10 proz. alkoholischer Lecithinlösung (Lecithin aus Eiern, Merck); e) 2 ccm dieser Lecithinlösung. Titration nach 5 Stunden bei 39°: a) 3,5, b) 32,5, c) 21,1, d) 13,5, e) 7,9 ccm n/10 HCl.

Ein Kontrollversuch mit Alkohol als solchem ergab jedoch, in Übereinstimmung mit Gizelts[1]) kürzlich veröffentlichten Beobachtungen, daß auch dieser allein in geringen Dosen das Steapsin kräftig aktivieren könne:

Versuch 31. Je 20 ccm Ölemulsion und 3 ccm Steapsin; dazu a) 10 ccm Wasser; b) 10 ccm Natriumcholat 1 Proz.; c) 10 ccm Wasser und 1 ccm Alkohol; d) 10 ccm Wasser und 2 ccm Alkohol; e) 10 ccm Wasser und 1 ccm 10 proz. alkoholischer Lecithinlösung; f) 10 ccm Wasser und 2 ccm alkoholischer Lecithinlösung von 10 Proz. Titration nach 5 Stunden bei 39°: a) 3,9, b) 18,0, c) 16,6, d) 33,0, e) 8,3, f) 19,1.

Es mag also vorläufig dahingestellt bleiben, ob das Aktivierungsvermögen konzentrierter alkoholischer Lecithinlösungen dem Steapsin gegenüber ausschließlich auf ihren Alkoholgehalt zu beziehen oder auch dem Lecithin als solchem eigentümlich sei.

Der Einwand Hewletts, die Wirksamkeit der gallensauren Präparate dürfte etwa auf eine Verunreinigung mit Lecithin zurückzuführen sein, könnte allenfalls für Platners Galle gelten, der nach Hammarstens[2]) Angaben Lecithin anhaften kann. Er gilt aber sicherlich nicht für die unter allen Kautelen rein dargestellten

[1]) A. Gizelt, Über den Einfluß des Alkohols auf die sekretorische Tätigkeit und die Fermente der Bauchspeicheldrüse. Pflügers Arch. **61**, 620 (1906).

[2]) Hammarsten, Zur Chemie der Galle, Ergebn. d. Physiol. **4**, 17, (1905).

Präparate von Glykocholsäure und Cholsäure und erscheint für die letzteren schon deswegen von vornherein ausgeschlossen, weil das gegen Alkaliwirkung sehr empfindliche Lecithin unmöglich die viele Stunden dauernde Einwirkung konzentrierter kochender Lauge bei der Cholsäuredarstellung überdauert haben könnte.

Wir hätten nun noch auf Grund unserer Versuche die Frage, zu erörtern, welche physiologische Rolle den gallensauren Salzen bei der Verdauung und Resorption der Fette zugeschrieben werden müsse.

Auf die ausgedehnte physiologische und klinische Literatur, welche sich mit dem Einflusse der Galle auf die Fettverdauung und auf die Störungen der letzteren bei Gallenabschluß beschäftigt, kann hier nicht eingegangen werden. Es dürfte genügen, auf die vortrefflichen zusammenfassenden Darstellungen von Magnus-Levy[1]) und A. Schmidt[2]) in v. Noordens Handbuche sowie auf die kürzlich erschienene unter Umbers Leitung ausgeführte Arbeit von Brugsch[3]) hinzuweisen.

„In Summa“, sagt Schmidt, „besteht der Einfluß, welchen die Gallenstauung auf die Resorption der Nahrung ausübt, in einer isolierten und dabei sehr hochgradigen Verschlechterung der Fettverdauung... Diese Störung wird auch durch Darreichung des Fettes in emulgierter Form (Milch) nicht ausgeglichen. Wir dürfen daraus schließen, daß die Hauptfunktion der Galle weniger in der Emulsionsbildung, als in ihrer Lösungsfähigkeit für Fettsäuren, Seifen, resp. ihrem resorptionsanregenden Einfluß auf die Darmepithelien beruht.“

Was nun speziell die Frage der Fettspaltung betrifft, sagt Schmidt: „Das aus dem Kote (bei Gallenabschluß) durch Ätherextraktion zu gewinnende Fett besteht, wie Fr. Müller nachgewiesen hat, zu drei Vierteln aus Fettsäuren bzw. Seifen und nur zu einem Viertel aus Neutralfett. Das besagt, daß die Fettspaltung bei Gallenabschluß in demselben Umfange vonstatten geht, wie unter normalen Verhältnissen, wo sie ebenfalls 75 Proz. beträgt.“

Wir können also auf Grund des vorliegenden Beobachtungsmaterials es sicherlich nicht ohne weiteres als wahrscheinlich bezeichnen, daß die schwere Schädigung der Fettresorption nach

---

[1]) Magnus-Levy, Physiologie des Stoffwechsels. Handbuch d. Pathol. des Stoffwechsels, herausgegeben von C. v. Noorden, 2. Aufl., 1, 34 (1906).

[2]) A. Schmidt, Magen- und Darmkrankheiten 3, 700.

[3]) Brugsch, Der Einfluß des Pankreassaftes und der Galle auf die Darmverdauung, Zeitschr. f. klin. Med. 58, 518 (1906).

Ausschluß der Galle etwa auf einem Ausbleiben der Wirkung gallensaurer Salze auf das Pankreassteapsin beruhe. Wir würden aber vielleicht auch einen Fehler begehen, wenn wir einen solchen Zusammenhang kurzweg als ausgeschlossen betrachten würden.

Wir müssen nämlich beachten, daß es für die Fettresorption vielleicht nicht gleichgültig ist, in welchem Teile des Darmes die Spaltung des Fettes zu Fettsäuren und Glycerin sich vollzieht. Wenn im Falle des Gallenabschlusses das im Kote auftretende Fett größtenteils gespalten erscheint, so wäre es denkbar, daß die Fettspaltung sich anstatt (wie normalerweise) in den oberen Darmabschnitten durch Fermentwirkung etwa in den unteren Darmabschnitten (und zwar etwa durch Bakterienwirkung) vollzogen habe, und daß infolge dessen die normale Resorption der Fettsäuren ausgeblieben ist. Quantitative Untersuchungen über den Grad der Fettspaltung und der Fettresorption in den einzelnen Darmabschnitten bei Gegenwart und Abwesenheit von Galle bzw. Cholaten sollen uns über diese Frage Klarheit verschaffen.

Weitere Untersuchungen sind ferner erforderlich, um die Art der Einwirkung der Galle bzw. der Cholate auf das Pankreassteapsin aufzuklären. Wir haben gesehen, daß diese Einwirkung zwar regelmäßig vorhanden ist, jedoch in ihrer Stärke, je nach der Beschaffenheit der Steapsinlösungen und anderer Faktoren, großen graduellen Schwankungen unterliegt und von einer geringen Steigerung bis zu einer 14fachen Verstärkung der Steapsinwirkung variieren kann. Wir beabsichtigen, durch quantitative Untersuchungen die hier vorliegende Gesetzmäßigkeit sowie die Einwirkung fördernder und hemmender Agenzien genauer zu studieren und hoffen so das Wesen dieser eigentümlichen Reaktion genauer aufklären zu können.

2. Einfluß der Galle auf das Trypsin.

A. Literatur.

Die verdauende Kraft der Galle als solcher ist sehr geringfügig. In Übereinstimmung mit einer Beobachtung Pawlows, derzufolge Hundegalle Fibrin zu verdauen vermag, sah A. Tschermak[1]), daß sich Fibrinflocken in frischer, einer Gallenfistel entnommenen menschlichen Galle bei Brutofentemperatur im Laufe

[1]) A. Tschermak, Notiz über das Verdauungsvermögen der menschlichen Galle, Centralblatt f. Physiol. **16**, 329 (1902).

einiger Stunden lösten; doch war der verdauende Effekt zu gering, um mit Mettschen Röhrchen kenntlich gemacht zu werden.

Dagegen liegen mehrere Angaben über eine Verstärkung der Trypsinwirkung durch Gallenzusatz vor.

Martin und Williams[1]) versetzten Eiweißlösungen (1,2 g koagulables Eiweiß enthaltend) mit Schweinspankreasextrakt. Nach drei Stunden bei 35° fanden sich ohne Gallenzusatz noch 0,53 g, mit Zusatz von Gallensalz (2 Proz.) nur mehr 0,15 g koagulables Eiweiß vor. Natriumglykocholat schien die Proteolyse weniger zu fördern als das rohe Gemisch der Gallensalze.

Nach Rachford[2])[3]) und Southgate[2]) befördert Galle deutlich die proteolytische Wirkung des (lebenden Kaninchen entnommenen) Pankreassekrets; Zusatz von ein wenig Salzsäure soll diese Wirkung noch um etwas steigern. Es betrug die in Lösung gegangene Menge von Portionen zu je 0,4 g getrockneten Fibrins nach 6 bis 8 Stunden bei Brutofentemperatur:

Ohne Gallenzusatz	0,061	0,075	0,065	0,078	0,146	0,097
Mit „	0,093	0,105	0,097	0,091	0,158	0,130
Ohne „	0,146	0,096	0,113	0,070	0,098	0,130
Mit „	0,187	0,122	0,130	0,087	0,134	0,178

Demnach würde also das Trypsin bei Gegenwart von Galle etwa um ein Viertel mehr leisten als ohne dieselbe.

Nach Knauthe[4]) verstärkt Karpfengalle in hohem Grade die tryptische Wirkung des Hepatopankreas dieses Fisches. 2,5 g Hepatopankreas verdauten im Laufe von 10 Stunden 0,92 g, nach Zusatz von 2 ccm Galle aber 1,84 g frischen Fibrins.

Im Gegensatz zu den vorstehenden positiven Angaben fanden Chittenden und Albro[5]), daß, wenn in künstlichen Pankreas-Verdauungsgemischen die Menge der Galle oder der Gallenbestandteile über ein bestimmtes geringes Quantum hinaus vermehrt wird, sich dem Vorgange der Proteolyse gegenüber eine Hemmungs-

---

[1]) S. Martin und D. Williams, A further note on the influence of bile and its constituents on pancreatic digestion. Proc. Roy. Soc. 48, 160; cit. Jahresber. f. Tierchemie 15, 264 (1890).

[2]) Rachford and Southgate, Influence of bile on the proteolytic action of pancreatic juice. Medical Record 1895, p. 878; Centralbl. f. Physiol. 10, 271.

[3]) Rachford, The influence of bile, of acids and of alkalis on the proteolytic action of pancreatic juice. Journ. of Physiol. 25, 165 (1899).

[4]) Knauthe, l. c.

[5]) Chittenden und Albro, Influence of bile and bile salts on pancreatic proteolysis. Journ. of Physiol. 1, 307 (1898).

wirkung geltend mache. Man müsse annehmen, daß das von anderen Autoren erwähnte, diesen Vorgang fördernde Vermögen der Galle weit überschätzt werde und daß es, insoweit es überhaupt vorhanden sei, mehr auf die Reaktion als auf die Gegenwart charakteristischer Gallenbestandteile zu beziehen wäre. Die Hemmungswirkung der Galle schien dem Nucleoalbumin bzw. den Schleimsubstanzen der Galle eigentümlich zu sein.

Bruno[1]), dessen Untersuchungen unter Pawlows Leitung ausgeführt worden sind, entnahm Hundegalle und Pankreassaft aus permanenten Fisteln. Die Eiweißverdauung wurde mit Mettschen Röhrchen auf Grund der Schütz-Borissowschen Regel bestimmt. Je 1 ccm frischen Pankreassaftes wurde mit 1 ccm des gekochten Sekretes verdünnt, und andererseits wurden Proben hergestellt, in denen $^1/_4$, $^1/_2$ oder $^1/_1$ des gekochten Saftes durch Galle ersetzt war. Das Mittel aus den Quadraten jener Zahlen, welche angeben, wie viele Millimeter an den Enden der Mettschen Röhrchen im Laufe von 10 Stunden bei 38° verdaut worden waren, betrug

	bei Fleisch-	Milch-	Broternährung
ohne Gallenzusatz im Maximum	7,61	7,59	6,09
mit „ „ „	13,19	13,26	14,08

Es handelte sich also günstigstenfalls um eine ungefähre Verdoppelung der Quadratwerte. Ein Zuviel an Galle schien die Wirkung zu schädigen.

Zuntz und Ussow[2]) beobachteten, daß sowohl Galle, als auch (und zwar in nur wenig geringerem Grade) die sogenannte Platnersche kristallisierte Galle die Trypsineinwirkung auf Eiweiß zu beschleunigen vermöge. Unter günstigen Umständen betrug die pro Gramm Hepatopankreas (Karpfen) in sechs Stunden verdaute Eiweißmenge ohne Galle 46,7, mit Galle 92 mg. Bei Ochsenpankreas und -galle betrug der unverdaute Rest von 5 g frischen Trypsins ohne Galle 1,242, mit Galle 0,766 g. Ochsenpankreas verdaute in vier Stunden:

Ohne Galle	127,5	186,8	96,8 mg	trockenen Fibrins
Mit 5 ccm Ochsengalle	192,5	233,5	113,0 „	„ „
„ 0,3 bis 0,5 Krist. Galle . . .	164,5	210,0	116,0 „	„ „

[1]) G. G. Bruno, La bile comme agent digestif (Travail du Laboratoire de Physiologie à l'Institut Impérial de Médicine expérimentale); Arch. des Sciences Biol. St. Petersbourg 7, 114—142 (1899).

[2]) N. Zuntz u. Ussow, Über die Einwirkung der Galle auf Verdauungsvorgänge. Verhandl. der physiol. Gesellschaft in Berlin; Arch. f. Anat. u. Physiol. 1900, S. 380.

Delezenne[1]) arbeitete wiederum mit Sekreten, die aus Fisteln gewonnen waren. „Des sucs, qui dans l'espace de douze heures digéraient 2 mm de tube de Mette, pouvaient digérer pendant le même temps 3 et même $3^1/_2$ mm, lorsqu'ils étaient additionés de $^1/_8$—$^1/_4$ de leur volume de bile." Gekochte Galle erwies sich ähnlich wirksam. Inaktiver Pankreassaft (aus einer temporären Fistel durch Sekretininjektion gewonnen) konnte durch Galle nicht aktiviert werden.

Schließlich ergaben Vernons[2]) Versuche über die Verdauung von gequollenem Fibrin zwar gelegentlich bei Zusatz von 3 Proz. Galle eine geringe Verstärkung der Trypsinwirkung. Die Mittelzahlen zeigten aber keine Unterschiede, und lagen die Ausschläge innerhalb der Fehlergrenzen. Bei Zusatz von 10 bis 40 Proz. Galle war eine Verzögerung merklich.

B. Untersuchungsmethode.

Die Widersprüche in den vorliegenden Literaturangaben veranlaßten uns, die Frage der Beeinflussung des Trypsinfermentes durch die Gegenwart von Galle einer neuerlichen experimentellen Bearbeitung zu unterziehen.

Trotzdem man bei Anwendung der natürlichen, von den Verdauungsdrüsen gelieferten Sekrete als solcher den physiologischen Verhältnissen zweifellos am nächsten kommt, haben wir, um die Versuchsbedingungen möglichst einfach und einheitlich zu gestalten, es vorgezogen, mit Trypsinpräparaten bzw. Pankreasextrakten zu arbeiten.

Da innerhalb der einzelnen Versuchsreihen von vornherein nur geringe Ausschläge zu erwarten waren, schien es uns im Interesse der Genauigkeit von großer Wichtigkeit, das Trypsin nicht, wie es die früheren Autoren getan haben, auf geronnene Proteïde, sondern auf Eiweißlösungen einwirken zu lassen.

Von der Methode von Thomas und Weber[3]) ausgehend, hat nun Volhard[4]) ein Verfahren der quantitativen Pepsin- und

---

[1]) C. Delezenne, L'action favorisante de la bile sur le suc pancréatique dans la digestion de l'albumine. Compt. rend. Soc. Biol. 54, 592 (1902).

[2]) H. M. Vernon, The conditions of action of the pancreatic secretion. Journ. of Physiol. 28, 390 (1902).

[3]) Thomas und Weber, Centralblatt für Stoffw. und Verdauungskr. 2, 14 (1901).

[4]) Volhard, Münchener Med. Wochenschr. 1903, Nr. 49.

Trypsinbestimmung ausgearbeitet, daß uns für die Zwecke unserer Untersuchungen besondere Vorteile zu bieten schien.

Löhlein[1]) hat kürzlich den Beweis erbracht, daß die Volhardsche Methode „mit einer einfachen, wenig Zeit in Anspruch nehmenden Technik eine befriedigende Genauigkeit der Resultate verbindet" und mit ihrer Hilfe die Gültigkeit der Schütz-Borissowschen Fermentregel für das Pepsin bestätigt.

Die Methode beruht darauf, daß ein käufliches Kaseïnpräparat (Kaseïn „Rhenania") unter Einhaltung gewisser Kautelen mit Hilfe von abgemessenen Mengen n/10 Natronlauge in Wasser gelöst wird. Eine bestimmte Menge der Lösung wird mit Trypsinlösung eine Zeitlang im Brutschranke belassen, hierauf mit einer abgemessenen Säuremenge angesäuert und mit Natriumsulfat gefällt. Das Filtrat zeigt eine gewisse Aciditätszunahme gegenüber einer analog, jedoch ohne Trypsinzusatz behandelten Kontrollprobe. Diese Aciditätszunahme bietet ein brauchbares Maß für den Umfang der stattgehabten Verdauung.

Bezüglich der Einzelheiten des Verfahrens verweisen wir auf die vorerwähnte Arbeit Löhleins.

Wir haben besonderen Wert darauf gelegt, durch Toluolzusatz zu den einzelnen Verdauungsproben die Fäulnis auszuschließen; eine keineswegs überflüssige Vorsicht, die von den früheren Autoren meist außer acht gelassen worden ist.

C. Versuche.

Wir gehen nunmehr zur Mitteilung unserer Versuche über:

Versuch 1. Je 100 ccm Kaseïnlösung und 2 ccm Trypsin Merck (1 : 100 $NaHCO_3$-Lösung von 1 Proz.); dazu a) kein Zusatz; b) 5 ccm Rindergalle; c) 15 ccm Rindergalle. Alle Proben mit Wasser auf 300 ccm aufgefüllt. Aciditätszunahme für ein Viertel der Flüssigkeit nach 24 Stunden bei 37°: a) 2,6, b) 5,4, c) 5,7 ccm n/10 HCl.

Versuch 2. 100 ccm Kaseïnlösung und 2 ccm Trypsinlösung (s. o.); dazu a) kein Zusatz; b) 5 ccm; c) 10 ccm; d) 15 ccm Rindergalle. Mit H_2O auf 300 ccm aufgefüllt. Aciditätszunahme für ein Viertel der Flüssigkeit nach 24 Stunden bei 37°: a) 3,4, b) 5,6, c) 5,3, d) 6,2 ccm n/10 HCl.

Versuch 3. Wiederholung von Versuch 2. Aciditätszunahme: a) 5,3, b) 5,1, c) 5,2, d) 5,1 ccm n/10 HCl.

Versuch 4. 100 ccm Kaseïnlösung und 2 ccm Trypsinlösung; dazu a) kein Zusatz; b) 5 ccm Rindergalle. Mit H_2O auf 300 ccm aufgefüllt. Aciditätszunahme für ein Viertel der Flüssigkeit: a) 5,0, b) 4,9 ccm n/10 HCl.

---

[1]) Löhlein, Über die Volhardsche Methode der quantitativen Pepsin- und Trypsinbestimmung durch Titration. Diese Beitr. 7, 120 (1906).

Versuch 5. 100 ccm Kaseïnlösung; dazu a) 1,5 ccm Trypsinlösung; b) 1,5 ccm Trypsinlösung und 5 ccm Schweinsgalle; c) 5 ccm Schweinsgalle. Aciditätszunahme für ein Viertel der Flüssigkeit nach 24 Stunden bei 38°: a) 6,2, b) 6,6, c) 1,1 ccm n/10 HCl.

Versuch 6. 100 ccm Kaseïnlösung und 2 ccm Trypsinlösung; dazu a) kein Zusatz; b) 1 ccm, c) 5 ccm, d) 80 ccm ganz frischer Rindergalle. Mit Wasser auf 300 ccm aufgefüllt. Aciditätszunahme für ein Viertel der Flüssigkeit nach 24 Stunden bei 35°: a) 5,7, b) 6,2, c) 8,8, d) 9,8 ccm n/10 H Cl.

Versuch 7. 100 ccm Kaseïnlösung; dazu a) 2 ccm Trypsinlösung; b) 10 ccm Rindergalle; c) 2 ccm Trypsinlösung und 10 ccm Galle; d) 2 ccm Trypsin und 10 ccm gekochter Galle. Mit Wasser auf 300 ccm aufgefüllt. Aciditätszunahme für ein Viertel der Flüssigkeit nach 24 Stunden bei 36°: a) 2,6, b) 0,1, c) 2,4, d) 2,2 ccm n/10 H Cl.

Versuch 8. Frisches Rinderpankreas, fein gehackt, wurde 6 Stunden lang bei Zimmertemperatur mit dem 10 fachen Volumen eines Gemenges von gleichen Teilen Glycerin und 1 Proz. Natriumcarbonatlösung extrahiert; filtriert. Je 100 ccm Kaseïnlösung und 10 ccm des Glycerinextraktes; dazu a) kein Zusatz; b) 10 ccm Galle. Auf 300 ccm aufgefüllt. Aciditätszunahme für ein Viertel der Flüssigkeit nach 24 Stunden bei 37°: a) 2,0, b) 1,8 ccm n/10 HCl.

Versuch 9. Rinderpankreas. Wiederholung des vorigen Versuches, jedoch mit der Abänderung, daß das Pankreas mit physiologischer Kochsalzlösung extrahiert wurde. Aciditätszunahme a) 5,8, b) 5,7 ccm n/10 HCl.

Versuch 10. Frisches Rinderpankreas wurde zerhackt. Je 20 g davon a) mit 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung; b) mit Rindergalle versetzt. Nach 5 Stunden in der Kälte mit 80 ccm physiologischer Kochsalzlösung extrahiert. Je 20 ccm dieser Lösung mit 100 ccm Kaseïnlösung versetzt und mit H_2O auf 300 ccm aufgefüllt. Aciditätszunahme nach 24 Stunden bei 38°: a) 5,5, b) 5,4 ccm n/10 HCl.

Versuch 11. Frisches Rinderpankreas wurde zerhackt, der Brei in zwei Portionen geteilt und die eine Portion 6 Stunden lang bei Zimmertemperatur mit Galle stehen gelassen. Sodann wurden beide Portionen mit dem 10 fachen Volumen physiologischer Kochsalzlösung extrahiert und die beiden Extrakte wie oben in bezug auf ihren Gehalt an verdauendem Ferment verglichen. Die Titration ergab in beiden Fällen genau denselben Wert (6,0 ccm n/10 HCl).

Versuch 12. Das Pankreas einer frisch getöteten Katze wurde zerkleinert und 24 Stunden mit dem 10 fachen Volumen physiologischer Kochsalzlösung bei Zimmertemperatur extrahiert. Die Schleimhaut des Duodenums und Jejunums wurde in gleicher Weise, jedoch bei 38° behandelt („Enterokinaselösung"). Je 100 ccm Kaseïnlösung und 10 ccm Pankreasextrakt; dazu a) kein Zusatz; b) 10 ccm Enterokinaselösung; c) 10 ccm Galle; d) 10 ccm Enterokinase und 10 ccm Galle. Alle Proben mit Wasser auf 300 ccm aufgefüllt. Aciditätszunahme für ein Viertel der Flüssigkeit nach 24 Stunden bei 38°: a) 9,3, b) 9,5, c) 8,8, d) 9,9 ccm n/10 HCl.

Versuch 13. Wiederholung des vorigen Versuches mit Organen vom Schweine: a) 3,5, b) 5,5, c) 4,3, d) 7,0 ccm n/10 HCl.

Überblickt man die Gesamtheit der von uns und anderen Autoren ausgeführten Beobachtungen, so wird man zugeben müssen, daß in vielen Versuchen, namentlich in denjenigen von Rachford, Bruno und Delezenne, welche nicht mit Trypsinpräparaten und Pankreasextrakten, sondern mit den natürlichen Sekreten ausgeführt worden sind, eine immerhin merkliche und außerhalb der Fehlergrenzen der angewandten Methoden liegende Verstärkung der Trypsinwirkung zu verzeichnen war.

Man könnte vielleicht gegen die Beobachtungen Rachfords den Einwand erheben, daß trotz langer Versuchsdauer (6 bis 8 Stunden) den Verdauungsgemischen kein Antisepticum zugesetzt worden ist. Gegenüber Brunos, mit größter Sorgfalt und Präzision ausgeführten Versuchen könnte geltend gemacht werden, daß zur Verdünnung bzw. zum Ersatze der Galle gekochter Pankreassaft diente. Nun entsteht aber, wie L. Pollak[1]) kürzlich gezeigt, durch Erhitzen von Pankreasextrakten eine die Trypsinwirkung hemmende Substanz. Man könnte also vielleicht daran denken, daß ein Mehrzusatz von Galle auf Kosten von gekochtem Pankreassaft die tryptische Wirkung auch deshalb gefördert haben könnte, weil ein Minus von Antitrypsin vorhanden war.

Diese Einwände gelten jedoch nicht für die Versuche von Knauthe[2]), Zunz und Ussow[3]) und ebensowenig für unsere positiven Beobachtungen (Versuch 1, 2, 6, 13).

Dem gegenüber stehen die zahlreichen negativen Beobachtungen von Chittenden und Albro[4]) und Vernon[5]) sowie die Mehrzahl unserer Versuche, welche sich auf Trypsin sowie auf Pankreasextrakt vom Rind, vom Schwein und von der Katze beziehen und welche eine „aktivierende" Wirkung der Galle vermissen ließen.

Chittenden und Albro sowie Vernon betonten, es solle keinen Augenblick geleugnet werden, daß der Zusatz von Galle die verdauende Wirkung des Pankreassaftes unterstützen könne. Der springende Punkt sei aber der, ob die Wirkung der Galle eine spezifische sei, oder ob sie ihr Vermögen nur ihrer Alkaleszenz oder dergleichen verdanke. Die Autoren neigen sich in bezug auf die proteolytische Wirkung letzterer Annahme zu.

---

[1]) L. Pollak, Zur Frage der einheitlichen und spezifischen Natur des Pankreastrypsins. Diese Beiträge 6, 95 (1905).

[2]) Knauthe, l. c.

[3]) Zunz und Ussow, l. c.

[4]) Chittenden und Albro, l. c.

[5]) Vernon, l. c.

Wir gelangen also zu dem Schlusse, daß die Förderung der Trypsinwirkung durch die Galle sehr wenig konstant und ihrer Intensität nach unvergleichlich geringer ist als die analoge Förderung der Steapsinwirkung.

Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der zuerst von Bidder und Schmidt festgestellten und seitdem von zahlreichen Forschern immer wieder bestätigten Tatsache, daß ein Abschluß der Galle vom Darm keine schwere Schädigung der Eiweißverdauung zu bedingen braucht.

Zusammenfassung.

1. Die fettspaltende Wirkung des Pankreassteapsins kann durch Zusatz einer geringen Gallenmenge unter Umständen bis auf das 14fache verstärkt werden.
2. Die wirksame Substanz der Galle ist nicht artspezifisch, thermostabil, durch Alkohol nicht fällbar, durch Äther nicht extrahierbar. Geringere Alkaleszenzänderungen sind für den Effekt unwesentlich; die Gallenasche ist unwirksam.
3. Die Wirkung ist zum Mindesten ihrer Hauptsache nach an die gallensauren Salze (Glyko- und Taurocholsäure) und zwar an die Cholsäurekomponente derselben geknüpft. Bereits wenige Milligramm reinen cholsauren Salzes können eine kräftige Wirkung entfalten.
4. Die Desoxycholsäure erwies sich annähernd ebenso wirksam wie die Cholsäure.
5. Die Oxydationsprodukte der Cholsäure (Cholansäure, Biliansäure, Ciliansäure) sind unwirksam.
6. Die Angabe Hewletts, derzufolge eine konzentrierte alkoholische Lecithinlösung die Steapsinwirkung zu verstärken vermag, wird bestätigt; doch ist die beschriebene Wirkung der Galle keineswegs auf ihren Lecithingehalt zu beziehen.
7. Der Grad der „Aktivierbarkeit“ verschiedener Steapsinlösungen durch Galle und gallensaure Salze ist sehr verschieden. Der Aktivierungsvorgang wird also außer vom Steapsin als solchem und den gallensauren Salzen noch durch weitere Faktoren beeinflußt.
8. Die Verstärkung der Trypsinwirkung durch Galle ist inkonstant und ihrer Intensität nach unvergleichlich geringer als die analoge Steapsinwirkung.

Wien, Juli 1906.

III.

Einige Daten zur Kenntnis der quantitativen Zusammensetzung verschiedener Körperflüssigkeiten von Seetieren (Fischen und einigen Wirbellosen).

Von **S. Baglioni.**

(Mit vier Tabellen.)

Aus der physiologisch-chemischen Abteilung der zoologischen Station zu Neapel.

(Der Redaktion zugegangen am 28. Juli 1906.)

Die im folgenden mitgeteilten chemischen quantitativen Bestimmungen betreffen vornehmlich den Gesamtgehalt an Eiweißkörpern und den Gehalt an stickstoffhaltigen Extraktivstoffen in verschiedenen Körperflüssigkeiten (besonders aber im Blutserum) von verschiedenen marinen Vertebraten sowie Evertebraten. Diese Untersuchungen wurden während eines längeren Aufenthaltes in der zoologischen Station zu Neapel ausgeführt. Besonders die an Körperflüssigkeiten von Selachiern angestellten, die eine gewisse Vollständigkeit beanspruchen dürften, scheinen mir auch ein gewisses theoretisches Interesse zu bieten. Bei diesen Tieren, die für gewöhnlich zu allen Jahreszeiten reichlich zu erlangen und leicht am Leben zu erhalten sind, wurden in der Tat fast die sämtlichen Körperflüssigkeiten (also Blutserum, Harn, Uterusflüssigkeit usw.) nach dieser Richtung untersucht, und an einigen davon erstreckten sich die chemischen Bestimmungen auch auf andere normale Bestandteile (z. B. die Alkalien).

Was die von mir angewendeten Methoden anbelangt, sei bemerkt, daß zur quantitativen Bestimmung der Eiweißkörper die betreffende immer frisch und möglichst rein gewonnene Flüssigkeit eventuell nach Defibrinierung und Zentrifugierung (und bei reichlicherem Eiweißgehalt nach Verdünnung mit Wasser) in

einer ersten Untersuchungsreihe, wenn nötig, nach Zusatz eines Tropfens Essigsäure, mit Alkohol versetzt wurde. Die flockige Ausfällung der Eiweißkörper wurde dann durch Erhitzen auf dem Wasserbade bis zum Sieden vervollständigt. In einer zweiten Untersuchungsreihe wurde anstatt des Alkohols und der Hitze Asaprollösung (10 g Asaprol + 100 ccm Wasser + 10 ccm konz. Salzsäure) nach den Angaben von Riegel[1]) angewendet, und zwar mit Vorteil. Zunächst erhält man so immer einen grobflockigen, leicht durch Filtration zu trennenden Niederschlag und zweitens genügt der einfache Zusatz von wenigen Tropfen der Asaprolmischung, um alle Eiweißkörper zur Fällung zu bringen. Außerdem kam auch die Eigenschaft des Asaprols, Albumosen und Peptone zu fällen, für mich in Betracht, denn ich beabsichtigte, dann an der filtrierten Flüssigkeit den Stickstoff der übrigen stickstoffhaltigen Extraktivstoffe quantitativ zu bestimmen. Kontroll- und Parallelversuche zeigten ferner — wie unten zu sehen ist — daß die Asaprolfällung in unserem Falle auch in anderer Hinsicht die Koagulation durch Alkohol und Erhitzen ersetzen kann.

Der auf diese Weise erhaltene Eiweißniederschlag wurde dann auf gewogenem Filter gesammelt, ausgewaschen und dann bis zum konstanten Gewicht im Trockenschranke bei 100° getrocknet. Durch Wägung erhielt man dann den Gehalt an getrockneten Eiweißkörpern.

Die filtrierte Flüssigkeit wurde auf dem Wasserbade eingeengt und hierauf deren Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt.

Die übrigen ev. chemischen quantitativen Analysen erfolgten stets nach den Vorschriften von Friedheim[2]) und von Hoppe-Seyler-Thierfelder[3]).

Auch hier will ich nicht versäumen, allen Herren, die mich in den vorliegenden Untersuchungen unterstützt haben, und zwar vor allem Herrn Geh.-Rat Prof. A. Dohrn, dem verehrten und

---

[1]) F. Riegel, Asaprol, ein Reagens auf Eiweiß, Albumosen, Peptone und Pepsin. Wien. klin. Wochenschr. 7, 981 (refer. im Chem. Zentralbl. 1895, I, S. 362). Derselbe, Neue Methode zur Bestimmung des Eiweißes im Harn, Wien. med. Bl. 1895, S. 761 (Chem. Zentralbl. 1896, I, S. 332). Derselbe, Asaprol als Reagens auf Alkaloide. Wien. med. Bl. 1896, Nr. 13 (Chem. Zentralbl. 1897, I, S. 264).

[2]) C. Friedheim, Leitfaden für die quantitative chemische Analyse. Berlin 1897.

[3]) Felix Hoppe-Seyler, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. Berlin 1903.

verdienstvollen Vater dieses Weltinstituts, sowie auch Herrn Dr. Martin Henze, dem Vorsteher der chemischen Abteilung, meinen verbindlichen Dank auszusprechen.

A. Wirbeltiere.

I. Knorpelfische, Selachier.

a) Scyllium stellare (catulus).

Ich konnte zahlreiche Bestimmungen an den Körperflüssigkeiten dieses Tieres ausführen, das wegen seiner Größe dazu sehr geeignet ist.

α) Blutserum.

Das Blut wurde bei allen Fischen aus der Art. caudalis (Aorta descendens) nach Abwischen und Abtrocknung der äußeren Hautdecke durch Abtrennung des Schwanzes entnommen: besonders wurde darauf geachtet, daß keine fremde Beimengung — vor allem durch Kloakenflüssigkeit — zum herabtropfenden Blute erfolgte. Das Tier wurde dabei in der Luft senkrecht zum blutaufnehmenden Gefäße gehalten. Dieses Verfahren zeigte sich als das beste, um möglichst viel Blut zu gewinnen. Hierauf wurde das Blut in dem zugeschlossenen Glasgefäße mit Glasperlen defibriniert und zentrifugiert. Das so gewonnene Serum war stets eine klare durchsichtige, mehr oder minder (nach den verschiedenen Tierspezies, z. B. an Torpedo mehr als bei den übrigen Selachiern) rotgefärbte Flüssigkeit. Eine gemessene Menge dieses Serums wurde den oben erwähnten chemischen Manipulationen unterworfen.

Versuch 1. 22. Juni 1905[1]). 25 ccm Blutserum von zwei Individuen. Alkohol- und Hitzekoagulation. Gewicht des Eiweißes: 0,816 g = 3,26 Proz. Der N-Gehalt der durchfiltrierten Flüssigkeit: 0,321 g = 1,28 Proz.

Versuch 2. 26. Juni 1905. Aus denselben zwei Tieren, die nach Verschluß der angeschnittenen Arterie im Hungerzustande am Leben erhalten wurden, gewinnt man noch 10 ccm Serum. Gleiche Behandlung wie oben. Gewicht des getrockneten Eiweißes: 0,185 g = 1,85 Proz. Stickstoffgehalt der eiweißfreien Flüssigkeit: 0,143 g = 1,43 Proz.

Versuch 3. 11. Juli 1905. Zwei weitere Individuen. 5 ccm Blutserum. Mit Asaprol behandelt. Gewicht des Eiweißes: 0,142 g = 2,84 Proz. N-Gehalt der eiweißfreien Flüssigkeit: 0,069 g = 1,38 Proz.

Versuch 4. 13. Juli 1905. Von einem der zwei vorangehenden Individuen, das die Verblutung hungernd überlebte, werden 5 ccm Blutserum

---

[1]) Das Datum gibt den Tag an, in welchem die Blutentnahme erfolgte.

erhalten und mit Asaprol versetzt. Gewicht der Eiweißkörper: 0,064 g = 1,28 Proz. Stickstoffgehalt der eiweißfreien Flüssigkeit: 0,069 g = 1,38 Proz.

Versuch 5. 19. August 1905. Ein großes kräftiges Individuum. Mehrere Proben von je 2,5 ccm Blutserum werden zum Teil durch Alkohol und Erhitzen und zum Teil mit Asaprol coaguliert. Gewicht der Eiweißkörper im Durchschnitt: 0,185 g = 7,4 Proz. N-Gehalt der eiweißfreien Flüssigkeit im Mittel: 0,031 g = 1,24 Proz.

Versuch 6. 22. August 1905. Von demselben die Verblutung überlebenden Scyllium werden eine Probe von 2,5 ccm und eine zweite Probe von 5 ccm Blutserum mit Asaprol versetzt. Gewicht der Eiweißkörper im ersten Falle: 0,089 g = 3,6 Proz. Gewicht der Eiweißkörper im zweiten Falle: 0,222 g = 4,4 Proz. N-Gehalt der eiweißfreien Flüssigkeit im ersten Falle: 0,034 g = 1,36 Proz.; im zweiten Falle: 0,065 g = 1,30 Proz.

Aus diesen Zahlen ergibt sich, 1. daß der Eiweißgehalt des Blutserums von Scyllium stellare ziemlich großen Schwankungen unterworfen ist. Er beträgt beim normalen Tiere im Mittel 4,5 Proz. (Schwankungen von 2,84 bis 7,4 Proz.) (Versuche 1, 3, 5); 2. daß das Blutserum dieser Tiere eine verhältnismäßig große Stickstoffmenge enthält, die den eiweißfreien Extraktivstoffen gehört, in Einklang mit den Untersuchungsergebnissen von v. Schröder[1]) u. a., die eine sehr große Menge Harnstoff in den Geweben dieser Tiere nachwiesen. Im Mittel wurde von mir an normalen Tieren ein solcher N-Gehalt zu 1,3 Proz. gefunden; er wies im Gegensatz zu den Eiweißkörpern keine beträchtlichen Schwankungen (von 1,24 bis 1,38 Proz.) auf (Versuche 1, 3, 5). Unter der Annahme, daß dieser N sämtlich Harnstoffstickstoff darstellt, würde der Harnstoffgehalt des Blutserums dieser Tiere 2,78 Proz. betragen, was wiederum mit den Ergebnissen von v. Schröder übereinstimmt, der im Blute des Scyllium catulus im Mittel 2,61 Proz. Harnstoff fand.

Ein beachtenswertes Ergebnis ist, daß nach reichlichen Blutverlusten am Blutserum dieser Tiere konstant eine Abnahme im Eiweißkörpergehalt nachweisbar ist, während der Stickstoffgehalt der eiweißfreien Extraktivstoffe (Harnstoff) rasch wieder zur Norm ansteigt. So fand ich zwei bis drei Tage nach der ersten Entblutung im Mittel 2,34 Proz. Eiweiß (mit Schwankungen von 1,28 bis 4 Proz.), d. h. ungefähr die Hälfte des normalen Prozentsatzes, während der N-Gehalt der Extraktivstoffe im Mittel 1,34 Proz. (mit Schwankungen von 1,33 bis 1,43 Proz.) betrug, d. h. ungefähr der normalen Menge entsprach. Dieses Ergebnis steht in Einklang

[1]) v. Schröder, Über die Harnstoffbildung der Haifische, Zeitschr. f. physiol. Chem. 14, 576 (1890).

mit anderen physiologischen Untersuchungen über die Bedeutung des Harnstoffs bei den Selachiern [1]).

β) Harn.

Am Harne der Selachier (Scyllium catulus) hat vor mir nur Herter [2]) — soweit ich aus der Literatur entnehmen konnte — chemische Untersuchungen angestellt. Seine Untersuchungen blieben aber unvollständig, vor allem deswegen, weil er keine quantitativen Bestimmungen der im Harne enthaltenen organischen Verbindungen ausführte: er hat nicht einmal den Gesamtstickstoff des Harns ermittelt. Indessen erfand er einen ebenso brauchbaren wie einfachen Apparat, mittels dessen man imstande ist, von Scyllium catulus genügende Mengen reinen Harns zu gewinnen; denn sonst bietet die Gewinnung des Harns bei diesen im Wasser lebenden Tieren große praktische Schwierigkeiten. Dieser nach Herter von mir zuerst angewendete Apparat besteht aus einer „passend geformten gläsernen Kanüle, welche durch einen Kautschukschlauch mit einem gläsernen Rezipienten (einem gewöhnlichen, mit einem Gummistöpsel zugeschlossenen weiten Reagenzglase) verbunden ist: ein an letzterem angebrachtes Ventil läßt die durch den Urin verdrängte Luft entweichen, verhindert aber den Eintritt von Wasser“ [3]). Die Kanüle wird in den Sinus urogenitalis (besonders Männchen von Scyllium catulus sind hierzu geeignet) eingebunden und darin dauernd belassen. Das Reagenzglas schwimmt an der Oberfläche des Wassers, während sich der Harn oberhalb des Gummistöpsels langsam ansammelt.

Die Tiere (Fleischfresser), an welchen folgende Untersuchungen angestellt wurden, kamen meist wohlgenährt und frisch aus dem Aquarium, während der Dauer des Versuches wurden sie ohne Nahrung belassen.

Versuch 2 [4]). 12. Februar 1906. Scyllium catulus ♂. Mittelgroßes Tier. Es wird der Hertersche Apparat angebracht. Harn von etwa zwei Tagen = 7,5 ccm. Klar, blaß hellgelblich, von charakteristischem,

---

[1]) Vgl. Baglioni, Zeitschr. f. allgem. Physiol. 6, sowie Zentralbl. f. Physiol. 19 u. 20.

[2]) Herter, Zur Kenntnis des Stoffwechsels der Fische, speziell der Selachier. Mitteil. aus der zool. Station zu Neapel 10, 2. Heft (1891).

[3]) Eine Abbildung dieses Herterschen Apparates in der Weise, wie er vom Scyllium getragen wird, findet man in der Abhandlung von Bottazzi, Archivio di Fisiologia, Vol. III, Fasc. V, 1906, p. 547—556.

[4]) Der erste Versuch an unter Anwendung von Kondom gesammeltem Harn ergab bloß 3 ccm Harn, dessen Gesamtstickstoff 0,0035 g betrug, d. h. 0,116 Proz.

schwachem Geruch nach Fischleim, sich überlassen, läßt keinen Niederschlag absetzen. Gegen Lackmuspapier stark sauer reagierend. An 7 ccm desselben wird nach Zusatz von Asaprol, welches keinen Niederschlag bedingt, der Gesamtstickstoff bestimmt. Dabei wird gefunden: N = 0,007 g = 0,1 Proz.

14. Februar 1906. 10 Uhr 45 Min. vorm. Harn von 48 Std. = 8,5 ccm. Eigenschaften wie oben. 7 ccm davon werden in einer Platinschale zuerst auf dem Wasserbade, dann im Trockenschranke getrocknet. Veraschung usw. zur quantitativen Bestimmung der Alkalien Na und K. (Dasselbe Verfahren, das ich zur nämlichen quantitativen Bestimmung der Alkalien an Muskeln, elektrischen Organen und Blutserum von Torpedo angewendet habe [1]).

Baryumchlorid erzeugt einen reichlichen Niederschlag — im Gegensatz zum Blutserum.

Ich fand: 0,205 g Alkalichloride (K Cl + Na Cl) und 0,019 g Kaliumplatinchlorid, woraus sich ergibt: 1. 2,92 Proz. Alkalichloride, berechnet auf frischen Harn, 2. KCl = 0,006 g, K = 0,003 g, NaCl = 0,199 g, Na = 0,078 g, somit in Prozenten K = 0,04 und Na = 1,11.

Von 10 Uhr 45 Min. vorm. des 14. bis 5 Uhr 30 Min. nachm. des 15. Februar 1906 (d. h. in einem Zeitintervall von $30^3/_4$ Std.) wurden 7 ccm Harn ausgeschieden. Diese Harnmenge wird Herrn Prof. Bottazzi übergeben, der sie für seine erste physiko-chemische Untersuchung am Selachierharne benutzte [2]).

Versuch 3. 7. März 1906. 4 Uhr 30 Min. nachm. wird der Apparat einem großen Exemplar, das während der Operation Sardinen erbricht, eingebunden.

9. März. 5 Uhr nachm. Harn = 8,5 ccm. Die gewöhnlichen äußeren Merkmale: 5 ccm Harn gaben 0,020 g N = 0,40 Proz. Spezifisches Gewicht (Pyknometer) nach Sprengel-Ostwald [3]) = 1038 bei 15° C.

10. März. 5 Uhr nachm. Harn = 10 ccm; darin 0,038 g = 0,38 Proz. N. Spezifisches Gewicht = 1038 bei 16° C. Spez. Gew. des Seewassers (worin das Tier lebt) = 1032 bei 16° C.

11. März. 5 Uhr nachm. Harn = 6,5 ccm; darin N = 0,34 Proz.; im ganzen wurden 0,022 g N ausgeschieden.

12. März. 5 Uhr nachm. Harnmenge = 7,5 ccm; darin Stickstoff 0,0239 g = 0,31 Proz. Spez. Gewicht bei 16° C = 1032.

13. März. 5 Uhr nachm. Harnmenge = 5 ccm; Ges.-N = 0,30 Proz.

Am 14. März wurde sehr wenig Harn gesammelt.

Am 15. März wurde das Tier verbluten gelassen. Bei der Sektion findet sich Nekrose und reaktive Entzündung der Gewebe am Sinus urogenitalis, offenbar infolge der für die Fixation der Kanüle nötigen Ligatur. Infolge Geweberuptur ging in den letzten Versuchstagen ein Teil des Harns verloren.

---

[1]) Vgl. Baglioni, Diese Beiträge 8.

[2]) Vgl. Fil. Bottazzi, Sulla regolazione della pressione osmotica negli organismi animali. Nota Iª. Archivio di Fisiologia, Vol. III, Fasc. III, Marzo 1906. Aus Versehen wurde in dieser Mitteilung vom Verf. der betreffende erste Versuch (S. 435) mit 5. Februar 1906 anstatt 15. Februar datiert.

[3]) Siehe Kohlrausch, Lehrbuch der praktischen Physik, 9. Aufl., Berlin 1901.

An zwei Proben von je 5 ccm Blutserum wird der Gesamtstickstoff bestimmt, nachdem man die eine Probe mit Alkohol und Erhitzen und die zweite mit Asaprol enteiweißt hatte.

Der Gesamtstickstoff der eiweißfreien Flüssigkeit betrug im Mittel 1,25 Proz.

Versuch 4. 18 März 1906. 9 Uhr vorm. Wird der Apparat einem Scyllium stellare ♂ eingebunden.

19. März. 5 Uhr 15 Min. nachm. Harnmenge = 4,6 ccm mit 0,45 Proz. N.

Versuch 5[1]. 18. März 1906. 10 Uhr vorm. Ein anderes frisch vom Aquarium herstammendes Scyllium ♂ wird mit dem Apparat versehen: das Tier erbricht während der Operation einige Sardinen.

19. März. 4 Uhr 15 Min. nachm. Harnmenge = 5,5 ccm. 5 ccm enthalten 0,0287 g N = 0,57 Proz. N.

20. März. 5 Uhr 15 Min. nachm. Harnmenge = 5,7 ccm. 5,7 gaben 0,0327 g N, somit = 0,57 Proz.

21. März. 5 Uhr nachm. Harnmenge = 9,5 ccm mit 0,49 Proz. N; im ganzen wurden 0,046 g N eliminiert.

22. März. 4 Uhr 45 Min. nachm. Harnmenge = 6,25 ccm mit 0,47 Proz. N; im ganzen wurden 0,029 g N ausgeschieden.

5 ccm Harn (von gestern und von heute) werden zur Alkalibestimmung verwendet. 5 ccm Harn gaben 0,1255 g Alkalichloride und 0,047 g Kaliumplatinchlorid.

Daraus ergibt sich: 1. 2,51 Proz. Alkalichloride, berechnet auf frischen Harn. 2. $KCl = 0{,}014$ g, $K = 0{,}007$ g, $NaCl = 0{,}1115$ g, folglich $Na = 0{,}043$ g; $K = 0{,}14$ Proz. und $Na = 0{,}86$ Proz.

23. März. 4 Uhr 40 Min. nachm. Harnmenge 6,4 ccm mit 0,48 Proz. N, d. h. im ganzen wurden in 24 Stunden 0,030 g N ausgeschieden.

24. März. 5 Uhr nachm. Harnmenge = 9 ccm mit 0,48 Proz. N, d. h. im ganzen wurden in 24 Stunden 0,043 g N eliminiert.

25. März. Weiße Fäces.

25. bis 26. März. Harnmenge = 11 ccm.

26. bis 27. März. Harnmenge = 4,5 ccm.

28. März. 5 Uhr nachm. Harnmenge = 5,6 ccm mit 0,41 Proz. N.

29. März. 6 Uhr nachm. Harnmenge = 4,5 ccm.

30. März. 5 Uhr 15 Min. nachm. Harnmenge = 4,75 ccm mit 0,61 Proz. N.

1. April. 6 Uhr 40 Min. nachm. Harnmenge = 3,5 ccm. Gesamtstickstoff = 0,40 Proz.

3. April. Seit zwei Tagen kein Harn mehr. Bei Inspektion findet man Nekrose der perikloakalen Gewebe und seitliche Öffnung des Sinus urogenitalis. Das Tier wird verbluten gelassen. 5 ccm Blutserum werden durch Alkohol und Erhitzen und 4,9 ccm desselben Blutserums durch Asaprol enteiweißt. Die N-Bestimmung der mit Alkohol enteiweißten Probe ergibt 1,288 Proz. N; die N-Bestimmung der zweiten mit Asaprol behandelten Probe ergibt 1,305 Proz., d. h. im Mittel 1,30 Proz.

Das Körpergewicht des getöteten Tieres betrug 1370 g.

---

[1]) Dieser Versuch wurde zum Teil in meiner vorläufigen Mitteilung (Zentralbl. f. Physiol. 20, Nr. 4) wiedergegeben.

Versuch 6. 14. April 1906. Einem seit mehr als drei Wochen hungernden Scyllium catulus ♂ wird um 12 Uhr 30 Min. nachm. die Kanüle eingebunden.

15. April. 3 Uhr nachm. Harnmenge = 3,6 ccm. Gesamtstickstoff = 0,58 Proz.

16. April. 12 Uhr 30 Min. nachm. Harnmenge = 7,6 ccm. Diese Menge wird dazu verwendet, um nach der Methode von Schlösing das NH^3 zu bestimmen. Nach zwei Tagen findet man keine nennenswerte NH^3-Menge.

17. April. 2 Uhr 20 Min. nachm. Harnmenge = 6,2 ccm mit 0,54 Proz. N; im ganzen wurden 0,034 g N eliminiert.

18. April. 3 Uhr 45 Min. nachm. Harnmenge = 9 ccm. Die ganze Menge wird zur NH^3-Bestimmung benutzt. Nach vier Tagen finden sich NH^3 = 0,000 34 g, d. h. etwa 0,004 Proz.

19. April. 3 Uhr 15 Min. nachm. Harnmenge = 6,8 ccm. Gesamtstickstoff = 0,66 Proz.; es wurden im ganzen in 24 Stunden 0,045 g N eliminiert.

20. April. Keine Harnmenge wegen Verstopfung der Kanüle.

Am 21. April wird das Tier verbluten gelassen. Die N-Bestimmung an einer durch Asaprol enteiweißten Blutserumprobe ergibt N = 1,48 Proz. Das getötete Tier wog 1736 g.

Aus diesen miteinander ziemlich gut übereinstimmenden Ergebnissen, die ich zum Teil in der Tabelle I zusammengestellt habe, ergibt sich unter anderem folgendes.

1. Die Menge des im Harn ausgeschiedenen Stickstoffs, der den stickstoffhaltigen Extraktivstoffen (hauptsächlich Harnstoff) angehört, tritt in einer Konzentration auf, die am hungernden Tiere ausnahmslos bedeutend geringer ist als die im Blute vorhandene. Wir sehen in der Tat, daß, während im Blute der verschiedenen Tiere die Menge des Gesamtextraktivstickstoffs zwischen 1,25 und 1,48 Proz. schwankt (eine Menge, die mit derjenigen in den vorangehenden Untersuchungen ziemlich gut übereinstimmt, vgl. S. 53), dagegen die Menge des Gesamtstickstoffs des Harns zwischen 0,30 und 0,66 Proz. schwankt. Nimmt man an, daß die von mir bestimmte N-Menge insgesamt dem Harnstoff angehört (was in sehr annähernder Weise der Fall ist), so entspräche der Harnstoff des Harns einem Prozentgehalt von 0,64 bzw. 1,41 Proz., während der des Blutes 2,67 bzw. 2,76 betragen würde.

Mit anderen Worten, es ist die Harnstoffkonzentration des Blutes ungefähr dreimal so groß als die des Harnes. Wir finden also hier die merkwürdige Tatsache, daß die Nieren nicht die ganze Harnstoffmenge, die im Blute vorhanden ist, ausscheiden, sondern bloß einen geringen Teil derselben, so daß das Blut in bezug auf die Menge des Harnstoffs immer dieselbe quantitative chemische Zusammensetzung aufweist. Diese

Tatsache steht in vollem Einklang mit der anderen oben hervorgehobenen, daß das Blut dieser Tiere nach Blutentnahme sehr rasch den ursprünglichen Harnstoffgehalt wieder erreicht: beide Tatsachen sind dadurch erklärlich, daß der Harnstoff für die Organe dieser Tiere eine unentbehrliche chemische Lebensbedingung darstellt, wie ich anderswo gezeigt habe.

Tabelle I.

Versuche	Zeit nach der Anbringung des Apparates	Harn		Blutserum
		Stickstoff Proz.	Menge des ausgeschiedenen N pro Tag und Körperkilo g	Gesamtextraktivstickstoff g/Proz.
III	am 3. Tage	0,40	—	—
	„ 4. „	0,38	—	—
	„ 5. „	0,34	—	—
	„ 6. „	0,31	—	—
	„ 7. „	0,30	—	—
	„ 9. „	—	—	1,25
IV	„ 2. „	0,45	—	—
V	„ 2. „	0,57	—	—
	„ 3. „	0,57	—	—
	„ 4. „	0,49	0,027 (im Mittel)	—
	„ 5. „	0,47		—
	„ 6. „	0,48		—
	„ 7. „	0,48		—
	„ 11. „	0,41	—	—
	„ 13. „	0,61	—	—
	„ 15. „	0,40	—	—
	„ 17. „	—	—	1,30
VI	„ 2. „	0,58	—	—
	„ 4. „	0,54	0,022	—
	„ 6. „	0,66		—
	„ 8. „	—	—	1,48

2. Unter der Annahme, daß die sämtlichen Verbrauchsprodukte des N-Stoffwechsels bei diesen Tieren durch den Harn zur Ausscheidung kommen, kann man aus diesen Untersuchungen (die, wie gesagt, im Hungerzustande der Tiere ausgeführt wurden) den Stickstoffumsatz berechnen, der für 1 kg Körpergewicht pro Tag 0,022 bis 0,027 g beträgt.

3. Schließlich haben wir in Tabelle II unsere Hauptergebnisse über die chemische Zusammensetzung des Scylliumharns zusammengestellt.

Tabelle II. Harn von Scyllium stellare.

Qualitative Merkmale: stark sauer (Lackmuspapier), klar, schwach gelblich, schwacher Geruch nach Fischleim.

Spezifisches Gewicht: 16° C	1038 bis 1032
Gesamtstickstoff Proz.	0,30 bis 0,66 g
NH_3 Proz.	0,004 g
Kalium Proz.	0,003 bis 0,007 g
Natrium Proz.	0,078 „ 0,043 g
Alkalichloride Proz.	2,92 „ 2,51 g

b) Torpedo ocellata[1]).

α) Blutserum.

Versuch 1. 29. Juni 1905. Trächtiges Weibchen. 2,6 ccm Blutserum, mit Alkohol und Erhitzen behandelt, gaben 0,153 g Eiweiß = 5,9 Proz.

Die Stickstoffbestimmung konnte wegen eines Unfalles nicht zu Ende geführt werden.

Versuch 2. 8. Juli. Trächtiges Weibchen. 3,6 ccm Blutserum, mit Alkohol und Erhitzen behandelt, gaben 0,191 g Eiweiß = 5,3 Proz.

Die Bestimmung des Ges.-N des enteiweißten Serums ergab 0,031 g N = 0,87 Proz.

β) Uterusflüssigkeit.

Versuch 1. 2,45 ccm Uterusflüssigkeit des ersten oben genannten Weibchens gab durch Alkohol und Erhitzen einen sehr spärlichen Niederschlag.

Gewicht des getrockneten Eiweißniederschlages: 0,037 g = 1,51 Proz. Der Gesamtstickstoff der enteiweißten Flüssigkeit betrug 0,0235 g = 0,96 Proz.

Versuch 2. Die Flüssigkeit stammte von dem zweiten oben besprochenen Weibchen. Von dieser Flüssigkeit wurde eine Probe von 2,5 ccm mit Asaprol und eine zweite Probe von 3,7 ccm mit Alkohol und Erhitzen koaguliert. In beiden Fällen erhielt man keinen sehr deutlichen Niederschlag.

Die mit Asaprol enteiweißte Flüssigkeit enthielt 0,023 g N = 0,92 Proz. Die mit Alkohol enteiweißte Flüssigkeit enthielt 0,038 g N = 1,03 Proz.

Versuch 3. 12. August 1905. 2,5 ccm Uterusflüssigkeit aus einer dritten T. ocellata werden mit Asaprol, und ebensoviele Cubikcentimeter derselben Flüssigkeit durch Alkohol und Erhitzen koaguliert. In beiden Fällen überaus schwacher Niederschlag.

Die erste Probe enthielt 0,020 g N = 0,80 Proz. Die zweite Probe enthielt 0,021 g N = 0,84 Proz.

---

[1]) Bezüglich der von mir ausgeführten chemischen Untersuchungen an Muskeln, elektrischen Organen und Blutserum dieses Tieres vgl. meine Mitteilung in diesen Beiträgen 8.

c) Torpedo marmorata.

α) Blutserum.

Versuch 1. 7. Juli 1905. Trächtiges Weibchen. 2,7 ccm Blutserum werden durch Alkohol und Erhitzen, und die gleiche Menge (2,7 ccm) mit Asaprol enteiweißt. Das Gewicht des Eiweißes der ersten Probe beträgt 0,134 g = 4,96 Proz., das Eiweißgewicht der zweiten Probe 0,091 g = 3,77 Proz.

Die erste durch Alkohol enteiweißte Flüssigkeit enthielt 0,026 g N = 0,96 Proz. Die zweite Probe ebenfalls 0,026 g N = 0,96 Proz.

Versuch 2. 3. Sept. 1905. 2 ccm Blutserum werden mit Asaprol enteiweißt. Der Gesamtstickstoff des enteiweißten Serums beträgt 0,021 g = 1,05 Proz.

β) Uterusflüssigkeit.

Versuch 1. Torpedo marmorata des obigen Versuchs 1. 5 ccm Uterusflüssigkeit mit Alkohol versetzt geben keinen deutlichen Niederschlag. 5 ccm derselben Flüssigkeit mit Asaprol versetzt geben einen überaus feinen Niederschlag, der durch das Filter geht.

Stickstoff der ersten Probe 0,049 g = 0,98 Proz. Die zweite Probe ebenfalls 0,049 g = 0,98 Proz.

d) Trygon violacea.

Blutserum.

Versuch 1. 29. Juni 1905. 7,15 ccm Blutserum mit Alkohol und Erhitzen koaguliert. Eiweißgewicht: 0,232 g = 3,24 Proz. Gesamtstickstoff des enteiweißten Serums: 0,082 g = 1,14 Proz.

Versuch 2. 22. August 1905. 2,5 ccm Blutserum durch Alkohol und Erhitzen koaguliert. Gewicht des Niederschlages: 0,109 g = 4,36 Proz. Stickstoff der enteiweißten Flüssigkeit: 0,038 g = 1,52 Proz.

II. Knochenfische, Teleostier.

Die chemischen Untersuchungen an Knochenfischen wurden in einem verhältnismäßig sehr bescheidenen Umfange ausgeführt wegen der praktischen Schwierigkeit, sich große Exemplare dieser Fische zu verschaffen.

a) Conger vulgaris.

Versuch 1. 23. August 1905. 1 ccm Blutserum wird mit Asaprol versetzt, 2 ccm Blutserum werden zuerst mit Alkohol und dann mit Asaprol behandelt. Gewicht des Eiweißniederschlages der ersten Probe: 0,042 g = 4,2 Proz. Stickstoff der enteiweißten Flüssigkeit: erste Probe 0,001 g = 0,1 Proz.; zweite Probe 0,0017 g = 0,085 Proz.

b) Dentex vulgaris.

Versuch 1. 23. August 1905. 2,8 ccm Blutserum mit Asaprol versetzt. Gewicht des Eiweißniederschlages: 0,206 g = 7,3 Proz. Stickstoff der enteiweißten Flüssigkeit: 0,0017 g = 0,06 Proz.

c) Orthagoriscus mola.

α) Blutserum.

Versuch 1. 20. April 1906. 4,5 ccm mit Asaprol enteiweißt. Stickstoff des enteiweißten Blutserums: 0,03 Proz.

β) Harn.

Saure Reaktion. 5 ccm mit Asaprol versetzt, kein Niederschlag. Gesamtstickstoff = 0,14 Proz.

Aus diesen Untersuchungen (vgl. Tabelle III) ergibt sich folgendes:

1. Im Blutserum aller untersuchten Rochen (Torpedo, Trygon), die der Klasse der Selachier, wie Scyllium, angehören, besteht ebenfalls ein verhältnismäßig großer Extraktivstickstoffgehalt (Harnstoff), der jedoch bei Torpedo etwas geringer ist als der des Blutserums von Scyllium stellare. Denn ich fand für das Blutserum von Torpedo im Mittel 0,96 Proz. N (als Harnstoff berechnet 2,05 g/Proz.) und für dasjenige von Trygon im Durchschnitt 1,33 Proz. N (als Harnstoff berechnet 2,84 Proz.).

Tabelle III. Gehalt an Eiweiß und Extraktivstickstoff verschiedener Flüssigkeiten einiger Seefische.

Tierspezies	Blutserum		Harn		Uterusflüssigkeit	
	Eiweißgehalt im Mittel Proz.	Extraktivstickstoffgehalt im Mittel Proz.	Eiweißgehalt im Mittel Proz.	Extraktivstickstoffgehalt im Mittel Proz.	Eiweißgehalt im Mittel Proz.	Extraktivstickstoffgehalt im Mittel Proz.
Selachier:						
Scyllium stellare	4,5	1,3	0	0,48	—	—
Torpedo ocellata	5,6	0,87	—	—	1,51 (Spur.)	0,91
Torpedo marmorata	4,4	1,0	—	—	Spuren	0,98
Trygon violacea	3,8	1,3	—	—	—	—
Teleostier:						
Conger vulgaris	4,2	0,09	—	—	—	—
Dentex vulgaris	7,3	0,06	—	—	—	—
Orthagoriscus mola	—	0,03	0	0,14	—	—

2. In dieser Hinsicht verhält sich das Blutserum der untersuchten Knochenfische ganz anders, indem sie sich dabei mehr den auf dem Lande lebenden Wirbeltieren nähern. Der Gesamtextraktivstickstoff ihres Blutserums ist bedeutend geringer als der des Serums

von Knorpelfischen: ich fand bei ihnen im Mittel 0,08 Proz. (was einem Harnstoffgehalte von 0,17 Proz. entspräche).

3. Die einzige von mir ausgeführte quantitative N-Bestimmung des Harns von Orthagoriscus mola würde zeigen, daß bei den Knochenfischen auch bezüglich der chemischen Zusammensetzung des Harns gegenüber derjenigen des eigenen Blutserums ähnliche Verhältnisse bestehen wie bei den Landwirbeltieren.

4. Was den Gehalt an Eiweißkörpern des Blutserums anbelangt, so besteht zwischen den Knorpel- und den Knochenfischen kein so durchgreifender Unterschied wie beim Extraktivstickstoffgehalt. Im Mittel fand ich für Scyllium stellare im normalen Zustande, wie gesagt (vgl. S. 53), 4,5 Proz. (Schwankungen von 2,84 bis 7,4 Proz.), für Torpedo und Trygon 4,6 Proz. (Schwankungen von 3,24 bis 5,9 Proz.), für Knochenfische 5,7 Proz. (Schwankungen von 4,2 bis 7,3 Proz.).

5. Die Uterusflüssigkeit von Torpedo zeigt ihrerseits einen gleichen Extraktivstickstoffgehalt wie das Blutserum desselben Tieres (d. h. im Mittel 0,93 Proz. gegenüber 0,96 Proz. des Blutserums), während der Eiweißkörpergehalt bedeutend geringer ist als der des Blutserums.

B. Wirbellose.

Die überaus mangelhaften Kenntnisse des Stoffwechsels dieser niederen Tiere gestatten zurzeit keine vollständige und übersichtliche chemische Bearbeitung ihrer Körperflüssigkeiten. Mitunter sind wir hier sogar nicht imstande, eine bestimmte Sekretionsflüssigkeit — wie z. B. den sogenannten Harn der Cephalopoden — in ihrer wirklichen physiologischen Bedeutung zu erkennen, ob sie nämlich eine Ausscheidung von Verbrauchsprodukten darstellt (Exkretion), oder aber ihr eine weitere physiologische Aufgabe zukommt (Sekretionsprodukte im engeren Sinne). In diesen Fällen überträgt man die geläufigen Kenntnisse der Wirbeltierphysiologie auf Grund manchmal ganz zufälliger und oberflächlicher Ähnlichkeiten, worin eine große Fehlerquelle gelegen ist.

In den vorliegenden Untersuchungen beschränkte ich mich deswegen nur darauf, vornehmlich in der Cölomflüssigkeit oder in dem Blute (bei den Tieren, die ein Blutgefäßsystem besitzen) sowohl den Eiweißgehalt, als den Gehalt an Stickstoff der Extraktivstoffe quantitativ zu bestimmen, unter Anwendung desselben Verfahrens, wie sie für die Wirbeltiere angewendet wurden. Solche

quantitativen Bestimmungen repräsentieren wohl die ersten Schritte zu einer richtigen Kenntnis der physiologischen Bedeutung dieser Körperflüssigkeiten.

Die vor mir meist gelegentlich und gar nicht systematisch ausgeführten quantitativen chemischen Untersuchungen an den Flüssigkeiten der verschiedenen Wirbellosen findet man im Buche von v. Fürth[1]) erwähnt, auf das ich hierdurch verweisen möchte.

I. Würmer.

a) Aphrodite aculeata.

Versuch 1. 18. Juli 1905. Aus drei Individuen. 8,6 ccm zentrifugierte Cölomflüssigkeit mit Asaprol behandelt geben einen sehr schwachen Niederschlag.

Stickstoff der enteiweißten Flüssigkeit: 0,004 g = 0,04 Proz.

b) Sipunculus nudus.

Versuch 1. 20. Juni 1905. Cölomflüssigkeit aus fünf Individuen. Wird nach Zentrifugierung vollständig klar. 24 ccm davon werden durch Alkohol und Erhitzen enteiweißt. Es entsteht ein weißer flockiger schwacher Niederschlag, deren Gewicht nach dem Trocknen 0,014 g beträgt, etwa 0,06 Proz.

Gesamtstickstoff der enteiweißten Flüssigkeit: 0,0038 g = 0,016 Proz.

Versuch 2. 25. Juni 1905. Cölomflüssigkeit aus fünf Individuen. Wird durch Zentrifugierung von morphologischen Bestandteilen befreit. 25 ccm, wie oben behandelt, gaben ebenfalls einen sehr schwachen Niederschlag.

Gesamtstickstoff der enteiweißten Flüssigkeit: 0,0028 g = 0,011 Proz.

II. Mollusken.

a) Aplysia limacina.

Versuch 1. 25. Juni 1905. Lakunärflüssigkeit eines großen Individuums. Zwei Proben von je 50 ccm. Mit Alkohol und Erhitzen behandelt geben beide Proben (A und B) einen deutlichen Niederschlag, dessen Gewicht nach dem Trocknen für A 0,145 g und für B 0,136 g beträgt, d. h. in Prozenten etwa 0,28 g. Stickstoffbestimmung beider enteiweißten Proben 0,0024 g = etwa 0,005 Proz.

Versuch 2. 13. Juli 1905. Die violettgefärbte Sekretionsflüssigkeit eines großen Exemplares. 2,5 ccm werden mit Asaprol versetzt. Gewicht des Trockenniederschlages: 0,014 g = 0,56 Proz.

Stickstoff der enteiweißten Flüssigkeit: 0,0042 g = etwa 0,17 Proz.

---

[1]) O. v. Fürth, Vergleichende chemische Physiologie der niederen Tiere. Jena 1903.

b) Octopus vulgaris.

Versuch 1. 20. Juni 1905 ♀. 19 ccm Blut aus der Hauptarterie des Rückens gewonnen. Mit Alkohol und Erhitzen behandelt läßt es eine große Menge weißen flockigen Niederschlages ausfallen.

Gewicht des Trockenrückstandes: 1,836 g = etwa 9,7 Proz. Gesamtstickstoff der enteiweißten filtrierten Flüssigkeit: 0,0017 g = 0,009 Proz.

Versuch 2. 1. Juli 1905 ♀. Trüber, fadenziehender Harn aus einem vor etwa 12 Stunden, infolge der Ligatur beider Harnleiter gestorbenen Octopus: nach Zentrifugierung werden 7 ccm mit Alkohol usw. versetzt. Fällung eines weißen flockigen Niederschlages, der im Trockenzustande 0,186 g wiegt, = 2,65 Proz. Gesamtstickstoff des enteiweißten Harns: 0,008 g = etwa 0,12 Proz.

Versuch 3. 13. Juli 1905 ♂. 6,8 ccm Blut mit Asaprol versetzt. Gewicht des Niederschlages: 0,794 g = 11,6 Proz. Gesamtstickstoff der enteiweißten Flüssigkeit: 0,0011 g = 0,016 Proz.

Versuch 4. Von demselben lebenden Tiere ohne vorangehende Ligatur der Harnleiter werden 6,2 ccm Harn aufgefangen. Mit Asaprol versetzt reichlicher Niederschlag; dessen Trockengewicht: 0,014 g = 0,22 Proz.

Gesamtstickstoff des enteiweißten Harns: 0,0033 g = 0,05 Proz.

III. Arthropoden.

Maja squinado.

Versuch 1. 11. Juli 1905. 10 ccm Blut durch Alkohol und Erhitzen koaguliert. Eiweißgewicht: 0,316 g = 3,16 Proz. Gesamtstickstoff des enteiweißten Filtrates: 0,002 g = 0,02 Proz.

Versuch 2. 16,5 ccm Blutserum (nach spontaner Blutgerinnung durch Filtration gewonnen) aus demselben Tiere mit Asaprol versetzt. Eiweißgewicht: 0,589 g = 3,57 Proz. Gesamtstickstoff des enteiweißten Serums: 0,002 g = 0,012 Proz.

Versuch 3. 12. August 1905. 10 ccm Blutserum aus einem anderen Individuum mit Asaprol versetzt. Eiweißgewicht: 0,284 g = 2,84 Proz. Gesamtstickstoff des enteiweißten Serums: 0,0016 g = 0,016 Proz.

Versuch 4. 15. August 1905. 10 ccm Blutserum aus dem vorangehenden Individuum mit Asaprol versetzt. Eiweißgewicht: 0,324 g = 3,24 Proz. Gesamtstickstoff des enteiweißten Serums: 0,0016 g = 0,016 Proz.

Aus diesen Untersuchungen ergibt sich unter anderem folgendes:

1. Alle inneren Körperflüssigkeiten der untersuchten Wirbellosen enthalten Eiweiß, der Gehalt daran weist aber bei den verschiedenen Tierspezies große Schwankungen auf. Den geringsten Eiweißgehalt besitzen alle niederen Wirbellosen, die keine wahren geschlossenen Blutgefäße besitzen, wo also die innere Körperflüssigkeit als Cölomflüssigkeit oder Lakunärflüssigkeit auftritt[1]). Dies geht deutlich aus der folgenden Tabelle hervor, in welcher

[1]) Vgl. R. Hertwig, Lehrbuch der Zoologie, 7. Aufl., Jena 1905.

ich die einschlägigen, von mir erzielten Ergebnisse zusammengestellt habe. Daraus kann man entnehmen, daß, während die Würmer (Cölomflüssigkeit) und die niederen Mollusken (Aplysia limacina: Lakunärflüssigkeit) einen verhältnismäßig sehr geringen Eiweißgehalt (Spuren, 0,06 bis 0,28 Proz.) besitzen, die höheren Mollusken (Octopus vulgaris) und die Arthropoden (Maja squinado), welche wahres Blut haben, einen bedeutend größeren Eiweißgehalt (10,6 bzw. 3,2 Proz.) in ihrem Blute aufweisen.

Tabelle IV. Gehalt an Eiweiß und Extraktivstickstoff von Körperflüssigkeiten verschiedener Wirbellosen.

Tierspezies	Cölomflüssigkeit bzw. Lakunärflüssigk. (Blut)		Blut		Andere Flüssigkeiten	
	Eiweißgehalt im Mittel Proz.	Extraktivstickstoffgehalt im Mittel Proz.	Eiweißgehalt im Mittel Proz.	Extraktivstickstoffgehalt im Mittel Proz.	Eiweißgehalt im Mittel Proz.	Extraktivstickstoffgehalt im Mittel Proz.
Würmer:						
Aphrodite aculeata	Spuren	0,04	—	—	—	—
Sipunculus nudus	0,06 (Spur.)	0,014	—	—	—	—
Mollusken:						
Aplysia limacina	0,28	0,005	—	—	—	—
„ „ violettes Sekret	—	—	—	—	0,56	0,17
Octopus vulgaris	—	—	10,6	0,012	—	—
„ „ Harn . . .	—	—	—	—	0,22	0,05
Arthropoden:						
Maja squinado	—	—	3,2	0,016	—	—

2. Alle inneren Körperflüssigkeiten der untersuchten Wirbellosen enthalten außerdem eine Menge von Extraktivstickstoff, dessen Gehalt aber im allgemeinen niedrig ist, und keine großen Unterschiede bei den verschiedenen untersuchten Tierspezies aufweist, wie aus der Tabelle IV deutlich hervorgeht. Seine Menge beträgt immer Bruchteile von Zehntelprozenten.

3. Schließlich möchte ich die Merkmale des Octopusharns hier hervorheben. Zunächst enhält derselbe eine zwar geringe Menge von Extraktivstickstoff, die aber größer ist als die im Blute vorhandene (0,05 g/Proz. gegen 0,012 g/Proz.), und dies würde besagen, daß diese Sekretionsflüssigkeit doch eine Ausscheidung darstellt, mit dem das Tier die Verbrauchsprodukte seines Stoffwechsels

eliminiert. Es enthält aber beständig (was übrigens schon andere vor mir festgestellt hatten) eine ziemlich große Eiweißmenge, was allerdings — nach unseren gewöhnlichen Auffassungen — gegen die eben ausgesprochene Deutung dieser Flüssigkeit als wirklichen Harn sprechen würde. Man könnte indessen immerhin den Umstand geltend machen, daß sich diese Tiere durch Gefräßigkeit (sie sind Fleischfresser und besonders Krebse sind ihr Futter) auszeichnen, und daß ihr Blut tatsächlich einen verhältnismäßig sehr großen Eiweißgehalt (10,9 Proz.) aufweist: der auf alle Fälle verhältnismäßig geringe Eiweißgehalt ihres Harns wäre dann die Folge einer „alimentären Albuminurie“. Eine solche Annahme könnte man vielleicht experimentell prüfen, indem man analoge quantitative Untersuchungen am Harne von durch lange Zeit hungernden Cephalopoden anstellte.

IV.

Über die Änderung der Assimilationsgrenze für Zucker durch Muskelarbeit.

Von Dr. **Giuseppe Comessatti** (Padua).

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

1.

Daß bei der Muskelarbeit Traubenzucker verbrannt wird, dürfte zurzeit von keiner Seite in Zweifel gezogen werden. Eine Reihe von Tatsachen spricht dafür, daß das Glykosemolekül die chemische Energie in einer Form enthält, die im Muskel besonders leicht in mechanische Energie übergeführt werden kann. Abgesehen von den älteren Erfahrungen (Chauveau und Kaufmann, Morat und Dufour, Cavazzani und Seegen), sprechen dafür jüngere Beobachtungen über die Erhöhung der Leistungsfähigkeit der Muskeln durch Zuckerzufuhr (U. Mosso u. Paoletti, v. Noorden, Langenmeijer, Herm. Frey, Schumburg, Frentzel, Hellstén) und in besonders schlagender Weise die Erfahrungen von Locke und Joh. Müller über die Bedeutung der Zucker für die Leistung des isolierten Herzens.

Nach Locke[1]) vermögen mit sauerstoffhaltiger Ringerscher Lösung gespeiste Kaninchenherzen stundenlang zu schlagen, wenn die Speisungsflüssigkeit Glykose enthält, und zwar kann Glykose in dieser Wirkung nicht durch Galaktose oder Rhamnose, l-Arabinose oder Glykoheptose ersetzt werden.

Joh. Müller[2]) konnte durch Untersuchung der durchgeleiteten Flüssigkeit zeigen, daß sie eine Abnahme des Zuckers erfährt, und Locke wies nach, daß diese Abnahme bei Durchströmung des ruhenden Herzens geringer ist als bei pulsierendem.

---

[1]) Journal of Physiology 31.

[2]) Zeitschr. f. allgem. Physiol. 3, 282.

Das genauere Studium der Assimilationsgrenze durch Franz Blumenthal[1]) eröffnet die Möglichkeit, den Verbrauch des Zuckers am intakten Tiere während relativer Muskelruhe und bei angestrengter Arbeit zu ermitteln. Ist auch hier, wo es sich um das ganze Tier handelt, der Gegensatz zwischen ruhendem und arbeitendem Muskel nicht so scharf zu gestalten wie am isolierten Herzen, so entsprechen doch einerseits die Versuchsbedingungen mehr den normalen Verhältnissen, andererseits ist, wegen der größeren Masse der beteiligten Muskeln, ein größerer quantitativer Ausschlag zu erwarten.

Überdies liegen klinische Erfahrungen vor, die dazu auffordern, die Beeinflussung der „Assimilationsgrenze“ für Zucker durch Muskelarbeit genauer zu studieren. Daß Muskelarbeit beim Diabetiker in der Regel (wenngleich nicht immer) die Zuckerausscheidung herabdrückt, ist seit Bouchardat und Trousseau sehr oft beobachtet[2]).

Bei einem Epileptiker beobachtete ferner Strauss[3]) in den ersten Stunden nach dem Anfalle keine Glykosurie auf Darreichung einer Zuckermenge, die in den folgenden anfallfreien Tagen eine solche zu erzeugen ausreichte.

2.

Ich habe mich in meiner Versuchsanordnung an die Angaben Fr. Blumenthals gehalten.

Es kamen männliche Kaninchen zur Verwendung, die während der Versuche ausschließlich mit Grünfutter ernährt wurden.

Die Untersuchung des vor und während des Versuches mittels Katheter entleerten Harnes geschah mit der Trommerschen und Nylanderschen Probe, eventuell mit Phenylhydrazin. Die Injektionen der lauwarmen, wässerigen Zuckerlösung wurden immer intravenös (durch eine Ohrvene) ausgeführt; die Menge der injizierten Flüssigkeit betrug 10 bis 15 ccm, die Dauer der Injektion drei bis fünf Minuten.

Durch Injektion von allmählich steigenden Dosen wurde zunächst für jedes Kaninchen die Sättigungsgrenze ermittelt, d. h. die größte Zuckermenge, die binnen fünf Minuten intravenös beigebracht werden konnte, ohne daß es zu Zuckerausscheidung kam. Durch weitere Injektionen wurde die Änderung dieses Wertes durch Muskelarbeit in der Weise festgestellt, daß die Kaninchen

---

[1]) Diese Beiträge 6, 329.

[2]) Vgl. Naunyn, Der Diabtes mellitus, 1898, S. 378 und v. Mering, Handb. d. inneren Med., Jena 1903, S. 1031.

[3]) Berl. klin. Wochenschr. 1899, S. 276.

nach der Injektion in einem Tretrad, das durch einen Motor in Bewegung erhalten wurde, zum Laufen gezwungen wurden.

Kaninchen lassen sich meist, wenngleich nicht in allen Fällen, in dieser Weise zu andauernder Arbeit zwingen. Sie unterliegen allerdings ungleich früher als Hunde der Ermüdung und verfallen bald in einen Zustand völliger Erschöpfung. Wenn ich trotzdem an diesem Versuchstiere festhielt, so geschah dies einmal, weil bei diesem Tiere die Verhältnisse des Glykoseverbrauches nach intravenöser Injektion genauer bekannt sind, sodann weil die Möglichkeit, beim Kaninchen die Zuckerinfusion durch die Ohrvenen vorzunehmen, den experimentellen Eingriff zu einem weniger eingreifenden gestaltet, als er sich beim Hunde ausführen ließe.

Die Verwendung des Strychnins zur Erzielung von angestrengter Muskelarbeit gab insofern beim Kaninchen kein befriedigendes Ergebnis, als die erzielten Krämpfe bei genügend großer Dosis sehr rasch zu einem paralytischen Stadium führen. Die Erhöhung des Zuckerverbrauches war hier weniger deutlich als bei der benutzten Versuchsanordnung. Dabei ist überdies zu berücksichtigen, daß eine schwere Intoxikation, die ja nicht die Muskeltätigkeit allein trifft, notwendig die Versuchsbedingungen in nicht übersehbarer Weise kompliziert.

3.

Ich fasse nachstehend meine Ergebnisse kurz zusammen.

Versuche mit Glykose.

A. Beeinflussung der Sättigungsgrenze.

Versuch 1. Kaninchen, 2,5 kg schwer. Sättigungsgrenze bei 2,20 g Glykose (nach 2,70, 2,55, 2,30 g ist der Harn zuckerhaltig, nach 2,10 g nicht mehr).

Bei Muskelarbeit ergibt die Injektion von 2,40 g noch leichte Glykosurie: keine sichere Steigerung der Sättigungsgrenze.

Versuch 2. Kaninchen, 3,1 kg schwer. Sättigungsgrenze bei 2,15 g (auf 2,40, 2,20 g Zuckerausscheidung, auf 2,10 g nicht mehr).

Bei Muskelarbeit steigt die Sättigungsgrenze über 2,60 g (weder 2,25, noch 2,50, noch 2,60 g machen Glykosurie).

Versuch 3. Kaninchen, 3,15 kg schwer. Sättigungsgrenze bei 2,50 g (Injektion von 2,20, 2,40 g negativ, nach 2,60 g Glykosurie).

Bei Muskelarbeit steigt die Sättigungsgrenze auf etwa 2,70 g (2,80 g erzeugen Glykosurie, nicht aber 2,50 und 2,60 g).

Versuch 4. Kaninchen, 2,65 kg schwer. Sättigungsgrenze bei 2,05 g (auf 2,15 g Glykosurie, auf 2,00 g nicht).

Bei Muskelarbeit steigt die Sättigungsgrenze auf 2,55 g (Injektion von 2,60 g gibt Glykosurie, von 2,50 und 2,40 g nicht).

Versuch 5. Kaninchen, 2,1 g schwer. Sättigungsgrenze bei 1,60 g (nach 2,00 g deutliche, nach 1,65 g schwache Glykosurie, nach 1,50 g keine mehr).

Bei Muskelarbeit steigt die Sättigungsgrenze auf etwa 1,88 g (Injektion von 1,90 g gibt Glykosurie, nicht aber von 1,85 g und 1,80 g).

Versuch 6. Kaninchen, 2,2 kg schwer. Sättigungsgrenze bei 1,60 g (Injektion von 2 g und 1,75 g gibt Glykosurie, nicht aber Injektion von 1,50 g).

Bei Muskelbewegung keine sicher erkennbare Steigerung der Assimilationsgrenze (Injektion von 1,80 g gibt starke Glykosurie).

Versuch 7. Kaninchen, 2,1 kg schwer. Sättigungsgrenze bei 1,55 g (Injektion von 1,60 g ergibt schwache Glykosurie, von 1,50 g keine mehr).

Bei Muskelarbeit steigt die Sättigungsgrenze auf 1,85 g (nach Injektion von 1,95 g schwache Glykosurie, nach 1,80 g keine).

Versuch 8. Kaninchen, 2 kg schwer. Sättigungsgrenze bei 1,60 g (nach Injektion von 1,65 g schwache Glykosurie, nach 1,50 g keine).

Auf Strychnininjektion, die rasch vorübergehende Krämpfe erzeugt, nach 1,90 g keine Glykosurie.

Die Resultate der Glykoseinjektionen stelle ich in der folgenden Tabelle zusammen.

Tabelle I.

Versuch	Gewicht kg	Sättigungsgrenze bei Ruhe g	Sättigungsgrenze bei Arbeit g	Differenz g
I . .	2,5	2,20	?	?
II . .	3,1	2,15	2,60	0,45
III . .	3,15	2,50	2,70	0,20
IV . .	2,65	2,05	2,60	0,55
V . .	2,10	1,60	1,88	0,28
VI . .	2,20	1,60	?	?
VII . .	2,10	1,55	1,85	0,30
VIII . .	2,00	1,60	1,90	0,30

B. Beeinflussung der Ausnutzungsgrenze.

Da zu erwarten war, daß die Einflößung von Glykose in kleinen oft wiederholten Dosen, wie sie Blumenthal zur Bestimmung der „Ausnutzungsgrenze“ verwendete, den Einfluß der Arbeit noch deutlicher hervortreten lassen würde, habe ich noch folgende Versuche ausgeführt.

Tabelle II. Die Menge des injizierten Zuckers.

Versuch	Gewicht kg	Anfangsdosis g	Folgende Dosen g	Gesamte Menge g	Zeit zwischen den Injektionen	Zuckerreaktion des Harns
IX . .	2,55	1,40	1,0	3,40	15 Min.	positiv
	—	1,20	1,0	3,20	15 „	„
	—	1,20	0,50	2,70	15 „	„
Bei Tretradarbeit		1,50	0,60	3,30	15 „	negativ
X . .	2,6	1,30	1,00	3,30	15 „	positiv
		1,10	0,50	2,60	15 „	„
Bei Tretradarbeit		1,40	0,60	3,50	15 „	negativ

Die Ausnutzungsgrenze ist in Versuch 9 mindestens von 2,70 auf 3,30 g, in Versuch 8 mindestens von 2,60 auf 3,30 g, also um 0,6 und 0,7 g gestiegen, was eine Mehrausnutzung des Zuckers um etwa 25 Proz. bedeutet.

Versuche mit Fruktose.

Versuch 11. Kaninchen, 2,3 kg schwer. Sättigungsgrenze für Fruktose (Merck) bei 2,10 g (2,25 g geben Glykosurie, 2,00 g nicht).

Bei Muskelarbeit steigt die Sättigungsgrenze auf 2,50 g (2,70 g geben nur schwache Glykosurie, 2,40 g keine).

Versuch 12. Kaninchen, 18 kg schwer. Sättigungsgrenze bei 1,30 g (1,50 und 1,80 g geben Glykosurie, 1,20 g nicht).

Bei Tretradarbeit steigt die Sättigungsgrenze auf etwa 1,40 g (1,60 g geben Glykosurie, 1,30 g nicht).

Versuch 13. Kaninchen, 1,8 kg schwer. Sättigungsgrenze bei 1,40 g (1,80 und 1,50 g machen Glykosurie, 1,30 g keine).

Bei Tretradarbeit Steigerung auf 1,70 g (1,80 g erzeugen Glykosurie, 1,60 g nicht mehr).

Versuch 14. Kaninchen, 2,1 kg schwer. Sättigungsgrenze bei 1,85 g (2,40 und 2,00 g geben Glykosurie, 1,70 g nicht).

Bei Tretradarbeit steigt die Sättigungsgrenze auf etwa 2,30 g (2,40 g erzeugen Glykosurie, 2,20 g nicht).

Versuch 15. Kaninchen, 2,25 kg schwer. Sättigungsgrenze bei 1,85 g (2,40 und 2,00 g erzeugen Glykosurie, 1,75 g nicht).

Bei Tretradarbeit Steigerung auf 2,25 g (2,30 g erzeugen Glykosurie, 2,20 g nicht mehr).

Tabelle III.

Versuch	Gewicht kg	Sättigungsgrenze bei Arbeit g	Dauer der Tretradarbeit	Sättigungsgrenze bei Arbeit g	Differenz g
XI	2,30	2,10	10 Min.	2,50	0,40
XII	1,80	1,30	10 „	1,40	0,10
XIII	1,80	1,40	10 „	1,70	0,30
XIV	2,10	1,85	10 „	2,30	0,45
XV	2,25	1,85	10 „	2,25	0,40

Versuche mit Galaktose.

Seit Hofmeister ist bekannt, daß diese Zuckerart im Tierkörper viel weniger prompt Verwendung findet als die Glykose und Fruktose, ebenso wie sie nach C. Voit[1]) zu geringerem Gly-

[1]) Zeitschr. f. Biol. 28, 245.

kogenansatz führt. Das Ergebnis meiner Versuche ist aus nachstehender Tabelle ersichtlich.

Tabelle IV.

Versuch	Gewicht des Versuchtieres kg	Sättigungsgrenze bei Ruhe g	Sättigungsgrenze bei Tretradarbeit g
XVI	2,65	0,50	0,55
XVII	2,00	0,30	0,40
XVIII	2,60	0,30	0,37

4.

Wie aus den Tabellen ersichtlich, erhöht die Arbeit im Tretrad die Assimilationsgrenze für Glykose und Fruktose in etwa gleichem Maße, zumeist um etwa 20 Proz., indes bei der Galaktose die Erhöhung nahezu in die Grenzen der Versuchsfehler fällt. Die bedeutende, durch Arbeit erzielte Erhöhung der Ausnutzungsgrenze für Glykose, d. h. jener maximalen Glykosemenge, die bei fortgesetzter Beibringung in kurzen Zwischenräumen keine Glykosurie erzeugt, steht damit in Einklang. Wie Blumenthal auseinandersetzt, müssen sich bei fortgesetzter Zuckerzufuhr die Organe mit hohem Ausnutzungskoeffizienten vom Typus der Muskeln und der Leber anders verhalten als jene mit niedrigerem Koeffizienten. „Die ersteren werden, wenn auch in langsamerem Tempo, andauernd Zucker aufnehmen, die letzteren nicht oder nur in sehr geringem Umfange. Der über die Sättigungsgrenze bis zur Ausnutzungsgrenze hinausgehende Zuckerverbrauch wird daher vorwiegend, wenn nicht ausschließlich, auf die Zuckerassimilation seitens der einen lebhafteren Zuckerstoffwechsel darbietenden Organe vom Typus der Leber und der Muskeln zu beziehen sein.“

Man erhält in unserem Falle, wo sich die Steigerung des Zuckerverbrauches unmittelbar an die nicht einmal sehr langdauernde Muskelarbeit anschließt, den Eindruck, daß die Glykose und die Fruktose, nicht aber die Galaktose, direkt, d. h. ohne zeitraubende chemische Umwandlungen vom Muskel ausgenutzt werden können, ähnlich wie das aus Lockes und Joh. Müllers Versuchen am isolierten Herzen hervorgeht. Könnte man die Masse der arbeitenden Muskeln und die Größe ihrer Leistung bestimmen, so wäre bei dieser Versuchsanordnung die Möglichkeit gegeben zu ermitteln,

inwieweit der Mehrverbrauch an Zucker der geleisteten Arbeit entspricht.

Bei der raschen Veränderung, die der Zucker durch die Muskelarbeit erfährt, wurde daran gedacht, daß es gelingen könnte, im Harne Produkte eines unvollkommenen Zuckerabbaues aufzufinden. Es wurde in einer Anzahl von Versuchen mit Hilfe der Ätherextraktion, der Überführung des allerdings sehr spärlichen Extraktes ins Zinksalz und mit qualitativen Proben im Harne der Arbeitsperiode auf Milchsäure gefahndet, jedoch ohne Erfolg.

V.

Über das Verhalten des Labferments bei Hunden mit Pawlowschem Nebenmagen.

Von Dr. **L. Blum** und Dr. **W. Boehme.**

Aus der medizinischen Klinik zu Straßburg (Direktor: Prof. v. Krehl).

In seinen grundlegenden Versuchen über die Sekretionsverhältnisse des Magens und ihre Beziehung zur Nahrung ist Pawlow[1]) für das Verhalten der Fermente von der Bestimmung des Pepsins ausgegangen. Für letzteres war durch die Mettsche Methode ein Verfahren gegeben, das mit geringen Saftmengen hinreichend exakte Resultate gab und durch seine rasche Ausführbarkeit eine große Menge von Bestimmungen zu machen gestattete. Aus der Länge der verdauten Eiweißsäulen berechnete Pawlow mit Hilfe des Schütz-Borissowschen Gesetzes, dessen Gültigkeit für das Mettsche Verfahren Samojloff nachgewiesen hatte, die Fermentmengen.

Dem zweiten im Magensaft enthaltenen Ferment, dem Lab, wurde dagegen keine Beachtung geschenkt, offenbar weil es an einer einwandsfreien Methode zur quantitativen Bestimmung, die auch vergleichende Untersuchungen zugelassen hätte, fehlte.

Vor einiger Zeit konnten nun Fuld und der eine von uns ein Verfahren der Labbestimmung beschreiben, das diesen Anforderungen genügte, und dessen Brauchbarkeit sich in einer großen Zahl von Bestimmungen bewährte[2]).

Wie damals gezeigt wurde, besitzt die Bestimmung des Labgehaltes vor der des Pepsins nicht unerhebliche Vorzüge. Bei der

---

[1]) Pawlow, Die Arbeit der Verdauungsdrüsen. Wiesbaden 1898.

[2]) L. Blum und E. Fuld, Über eine neue Methode der Labbestimmung und über das Verhalten des menschlichen Magenlabs unter normalen und pathologischen Zuständen. Berl. klin. Wochenschr. 1905, Nr. 44a.

Pepsinwirkung spielen, wie neuere Untersuchungen gezeigt haben [1]), behindernde Substanzen eine Rolle, die bei Verwendung des Mettschen Verfahrens deutlich zum Ausdruck gelangt. Auch der Hundemagensaft scheint solche kurz als Antipepsin bezeichnete Stoffe zu enthalten. Für das Lab kommen solche hemmende Substanzen, wie wir uns durch Versuche überzeugen konnten, im normalen blutfreien Magensaft nicht vor. Ein weiterer Vorzug der Labbestimmung liegt in der außerordentlichen Wirksamkeit des Ferments; es kommen dadurch viel größere Ausschläge zustande, so daß eine feinere Abstufung ermöglicht ist; bei dem Mettschen Verfahren betragen die Differenzen oft nur einen Millimeter oder Bruchstücke eines solchen, was bei mangelhafter Darstellung der Röhrchen sehr leicht zu Irrtümern führen kann.

Unter diesen Umständen schien es uns angezeigt, das Verhalten des Labferments an Hunden mit Pawlowschem Nebenmagen zu untersuchen. Bei der spezifischen Wirkung des Labferments auf Milch — die Vorgänge bei der Plasteïnbildung sind ja noch völlig unaufgeklärt — war es von Interesse zu prüfen, ob nach Milchnahrung der Magen einen an Lab besonders reichen Saft sezerniert. Solche Versuche sind nur an Hunden mit Nebenmagen möglich, da Untersuchungen an Magensaft, der Milchbestandteile enthält, infolge der Verteilung des Labferments [2]) auf den Käse und den Saft exakte Bestimmungen nicht zuläßt. Versuche in dieser Richtung liegen von Arthus [3]) vor, der nach Einbringen von Wasser, 1 proz. Kochsalzlösung und 4 proz. Laktoselösung in den Magen von hungernden Hunden und Menschen keine Labsekretion beobachten konnte, wogegen nach Milchzufuhr labhaltiger Saft ausgeschieden wurde.

Wir stellten unsere Versuche an einem Hunde an, der nach der von Pawlow angegebenen Methodik operiert war; Vorversuche waren bei einem anderen, ebenso operierten Tiere angestellt worden. Durch einen glücklichen Zufall konnten wir uns von der übereinstimmenden Funktion des großen und kleinen Magens ohne Anlegung einer Fistel des großen Magens überzeugen; es bestand nämlich zwischen Magenblindsack und Hauptmagen ein Ventil-

---

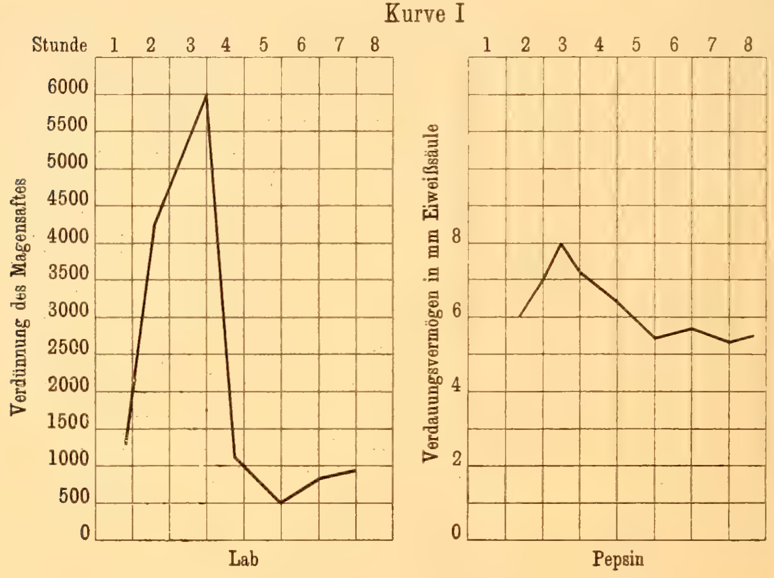
[1]) Schwarz, Zur Kenntnis der Antipepsine. Diese Beiträge 6, 524. Blum und Fuld, Über das Vorkommen eines Antipepsins im Magensaft. Zeitschr. f. klin. Medizin 58, Heft 5.

[2]) Reichel und Spiro, Fermentwirkung und Fermentverlust. Diese Beiträge 6, 68 und 7, 479.

[3]) Arthus, Sur la labogénie, action labogénique du lait. Journ. de physiol. et de pathol. générale 5, 795.

verschluß, der durch Einführung der Sonde in bestimmter Richtung den Inhalt des großen Magens zu gewinnen gestattete. Unter den gewöhnlichen Versuchsbedingungen war dagegen der Magenblindsack ganz dicht abgeschlossen, so daß Nahrungsbestandteile nie das Sekret desselben verunreinigten. Durch Versuche überzeugten wir uns noch, daß nach Einbringen von Farblösungen, wie Kongo- und Methylviolettlösungen, in den Hauptmagen der Saft des kleinen Magens völlig klar und ungefärbt blieb.

Kurve I



Lab- und Pepsinsekretion nach Genuß von 200 g Brot.

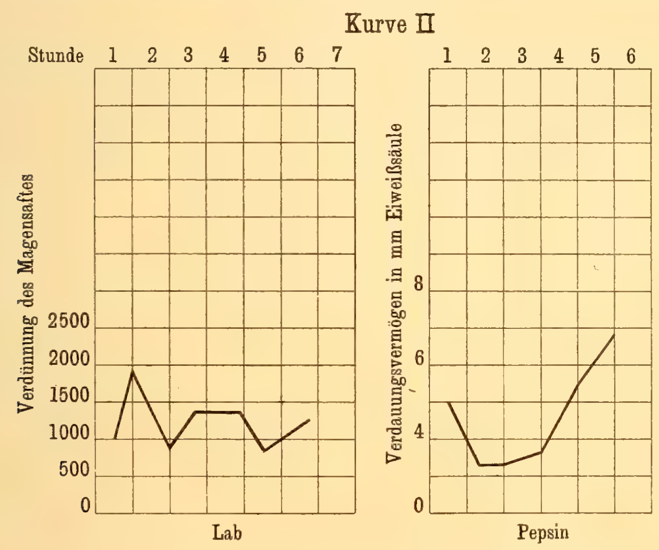
Entsprechend den Versuchen Pawlows erhielt der Hund je 200 g Fleisch, 200 g Brot oder 600 g Milch; der Magensaft wurde stündlich aufgefangen und in den stündlichen Portionen zuweilen Pepsin und Lab, zuweilen nur letzteres bestimmt. Die Pepsinbestimmungen wurden nach dem Mettschen Verfahren ausgeführt; für das Labferment wandten wir die oben bereits angeführte Methode an. Wir bedienten uns dabei einer 10 proz., aus Eckenbergschem Milchpulver dargestellten Milch, der 4 pro Mille Chlorcalcium zugesetzt war. Je 4,5 ccm dieser Milch wurden mit 0,5 ccm Magensaft oder absteigenden Verdünnungen desselben versetzt, die Proben wurden 2 Stunden bei 16° stehen gelassen und darauf für 3 Minuten in ein Wasserbad von 37° gebracht. Die niedrigste noch wirksame Verdünnung gab den Labgehalt an[1]).

[1]) Betreffs Einzelheiten der Methodik sei auf die erwähnte Arbeit verwiesen.

Die Versuche mit den einzelnen Nahrungsmitteln wurden des öfteren wiederholt. Für die Mengen des sezernierten Magensaftes und des Pepsins stimmen unsere Zahlen gut mit denen Pawlows überein, so daß wir auf eine Wiedergabe derselben verzichten. Das Verhalten des Labferments zeigen die Kurven I bis III, denen wir zum Vergleich die von Pawlow für das Pepsin gewonnenen zur Seite stellen.

Alle Bestimmungen beziehen sich auf eine Milch vom Labwert 1 : 700 000 (Lab Witte). Zwecks besserer Übersichtlichkeit der Kurven haben wir in den Tabellen eine Verdünnung von 1 : 500 als Ordinate genommen, während wir in unseren Versuchen von

Kurve II



Lab- und Pepsinsekretion nach Genuß von 600 g Milch.

der Verdünnung 1 : 100 ausgegangen sind, wodurch der Verlauf der Kurven natürlich noch präziser wird.

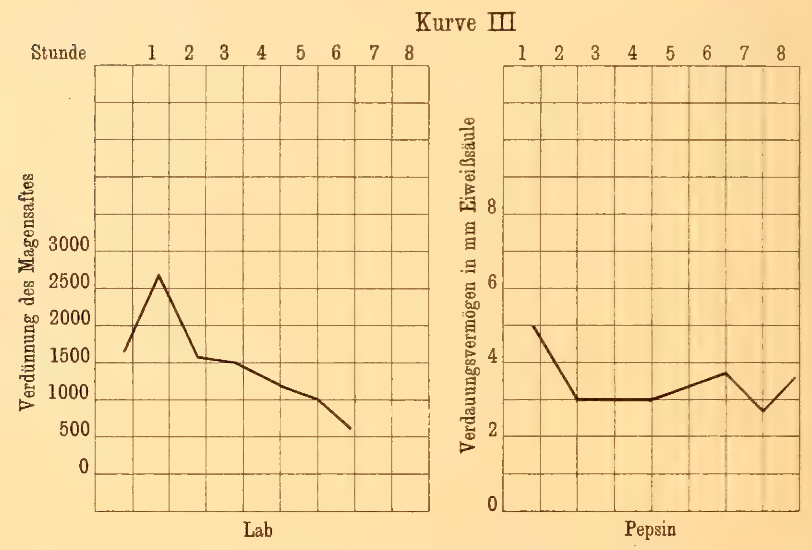
Die mitgeteilten Kurven stellen den Typus dar, dem wir in unseren Versuchen am häufigsten begegneten und den wir daher als charakteristisch ansehen zu können glauben.

Geringe Abweichungen von diesem Typus, wie Verschiebung des Maximums um eine Stunde, oder auch sonstige kleine Abweichungen im Verlaufe der Kurve haben wir zuweilen beobachtet; Pawlow machte ähnliche Wahrnehmungen bei seinen Versuchen, ohne für diese Unregelmäßigkeiten eine Erklärung finden zu können.

Die Betrachtung der Resultate ergibt, daß für das Lab die gleichen Verhältnisse wie für das Pepsin obwalten. Einer jeden

Nahrung entspricht ein besonderer Verlauf der Sekretionskurve. Der Brotsaft enthält die größten Mengen von Labferment, der Milchsaft die kleinsten, und zwar beträgt der Gehalt des Brotsaftes etwa das Drei- bis Vierfache, der des Fleischsaftes das Doppelte des Gehaltes des Milchsaftes in den Stunden der maximalen Ausscheidung.

Der Vergleich mit der Pepsinabscheidung nach den einzelnen Nahrungsmitteln zeigt, daß auch in bezug auf die Fermentmengen ein völliges Parallelgehen der beiden Enzyme herrscht; bei beiden hat der Brotsaft die intensivste Wirkung, der Michsaft die schwächste. Bei dem Labferment treten diese Unterschiede noch viel stärker



Lab- und Pepsinsekretion nach Genuß von 200 g Fleisch.

hervor als beim Pepsin, was mit den oben hervorgehobenen Vorzügen der Bestimmung dieses Ferments zusammenhängt.

Das Parallelgehen der Pepsin- und Labmengen bei den einzelnen Nahrungsarten läßt den Gedanken aufkommen, daß die Wirkung beider Fermente an denselben Komplex gebunden ist, eine Ansicht, die namentlich von Pawlow[1]) verteidigt wird. Gegen eine solche Deutung, gegen die eine Reihe von Arbeiten spricht, wäre der Verlauf der Pepsin- und Labkurve in ihren Einzelheiten anzuführen. Bei keiner Saftart fallen die Maxima der beiden

---

[1]) Pawlow und Paratschuk, Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 415.

Fermente zusammen, die Kurve des Fleischsaftes zeigt z. B. den höchsten Labgehalt in der zweiten, den höchsten Pepsingehalt in der ersten Stunde, demgemäß ist auch der ganze weitere Verlauf der Kurve verschieden. Ganz das gleiche läßt sich für die Pepsin- und Labmengen bei dem nach Brot und Milch sezernierten Saft feststellen.

Aus den mitgeteilten Versuchen ergibt sich demnach, das für das Labferment eine ähnliche Anpassung an die einzelnen Nahrungsmittel vorhanden ist wie für das Pepsin. Auffallend ist dabei, daß die Milchnahrung, für die man vom teleologischen Standpunkt aus die stärkste Sekretion erwarten würde, gerade die schwächste Fermentausscheidung bewirkt. Des weiteren ergeben sich aus den Kurven die Vorzüge der Bestimmung des Labs vor der des Pepsins, die eine größere Berücksichtigung dieses Ferments bei allen Versuchen über die Sekretionsverhältnisse des Magens rechtfertigen würden.

VI.

Über den Komplementverbrauch bei der Hämolyse artfremden Blutes im Tierkörper.

Von Dr. **G. Lefmann,**
Assistenten der medizinischen Universitätsklinik.

Aus dem pharmakologischen Institut zu Heidelberg (Prof. Gottlieb).

Die Wirkungen der Transfusion artfremden Blutes sind seit den bekannten klassischen Versuchen von Landois Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen; neuerdings sind von Mioni[1]) in dem physiologischen Laboratorium der Universität Genf wieder derartige Versuche angestellt worden, und zwar über die Wirkung von Kaninchen-, Pferde-, Hammel- und Rinderblutinjektionen in den Blutkreislauf des Hundes. Mioni kam dabei unter anderem zu folgenden Resultaten:

„En injectant rapidement dans les veines d'un chien le sang défibriné ou les globules sanguins d'un animal, dont les globules sont hémolysés par le plasma du chien, on constate que le sang au chien pris dans une artère, devient incoagulable pendant quelque temps, et que la pression artérielle subit une chute plus ou moins prolongée.

Une seconde injection faite quelques heures ou quelques jours après la première n'exerce plus d'action marquée ni sur la pression artérielle, ni sur la coagulation du sang.“

Mioni hat weiterhin[2]) die Wirkung der Injektion artfremden Blutes beim Kaninchen untersucht; er verwandte hierbei Rinder-, Ziegen- und Rattenblut, das durch destilliertes Wasser erst lackfarben und durch Hinzufügung von Kochsalz wieder isotonisch gemacht worden war, und stellte fest, „qu'il existe un raport entre l'action d'un extrait globulaire sur la pression sanguine d'un animal

---

[1]) Mioni, M. G., Compt. rend. hebdomadaires des séances de la société de biologie, Tome LVI, No. 16.

[2]) Ibid. No. 22.

et le pouvoir hémolytique vis-à-vis des globules dont on a tiré l'extrait".

Eine Ergänzung erfuhren diese Versuche durch Batelli[1]), der feststellte, daß im Hunde- und im Kaninchenblut eine rapide Auflösung derjenigen injizierten Blutkörperchen erfolgt, die vom Hunde- bzw. Kaninchenserum auch in vitro gelöst werden, und daß nach der Injektion der Blutkörperchen die hämolytische Wirkung des Hunde- bzw. Kaninchenserums proportional der injizierten Menge abnimmt, sogar gleich Null werden kann, daß ferner für das Kaninchen die Bestandteile (le contenu) nur derjenigen roten Blutkörperchen giftig sind, die auch von seinem Plasma gelöst werden können.

Um den Parallelismus zwischen Hämolyse und Giftwirkung bei verschiedenen Blutarten zu erhärten, injizierte Batelli Kaninchen Hunde- und Rinderblutkörperchen und wies nach, daß diese Blutarten oder deren Extrakt bei Kaninchen Blutdrucksenkung machen, wenn das Serum derselben der fremden Blutart gegenüber hämolytische Fähigkeit gewonnen hat, und daß die injizierten roten Blutkörperchen sehr rasch agglutiniert werden; dieselben Erscheinungen traten ein, wenn nur Blutkörperchenschatten injiziert wurden; die Blutdrucksenkung und den rasch erfolgenden Tod der Tiere führt Batelli auf Verstopfung der Äste der Arteria pulmonalis durch agglutinierte Stromata zurück.

Bei diesen Untersuchungen sind zwei Angaben besonders bemerkenswert und weiterer Analyse zugänglich; einmal, daß nach Mioni die intravenöse Injektion von durch Hundeblutserum löslichen Blutkörperchen den Blutdruck eines Hundes herabsetzt, daß aber eine zweite innerhalb einiger Stunden oder Tage ausgeführte gleichartige Injektion auf den Blutdruck ohne Wirkung bleibt; ferner, daß nach Batelli durch die intravenöse Injektion von im Hundeblutserum löslichen Blutkörperchen die hämolytische Fähigkeit des Hundeserums gegenüber diesen Blutkörperchen proportional der injizierten Menge abnimmt. Ich versuchte zunächst die letztere der von Batelli gemachten Beobachtungen aufzuklären.

Es wurde hierzu Hunden defibriniertes Kaninchenblut in die Vena jugularis injiziert, und zwar so viel Cubikcentimeter, als $^1/_2$ Proz. ihres Körpergewichtes in Grammen entsprach, und das Hundeblutserum vor und nach der Injektion auf seine hämolytische

[1]) Batelli, M. F., Compt. rend. hebdomadaires des séances de la société de biologie, Tome LVI, No. 19.

Fähigkeit gegenüber Kaninchenblutkörperchen geprüft. Als Beispiel mag folgender Versuch dienen.

Hund von 6900 g erhält $3^h 30$ 0,04 g Morphin. mur. subcutan. Nach Präparation der l. Carotis und der r. V. jugularis $4^h 22$ erste Entnahme von 30 ccm Blut aus der Carotis zur Serumgewinnung. $4^h 28$ bis $4^h 33$ Injektion von 34,5 ccm defibrinierten körperwarmen Kaninchenblutes in die r. Vena jugularis. Danach heftige Schmerzäußerung; mäßige Dyspnoe. $4^h 50$ zweite Entnahme von 30 ccm Blut zur Serumgewinnung. $5^h 10$ dritte Entnahme von 30 ccm Blut zur Serumgewinnung. Tötung durch Verblutung.

Die zur Serumgewinnung entnommenen Blutproben wurden alsbald zentrifugiert; die erste Blutprobe ergab normales, grauweißliches Serum, das sich aus einem völlig geronnenen Blutkuchen ausgepreßt hatte. Die nach der Injektion entnommenen Blutproben zeigten unvollkommene Gerinnung; über der noch ziemlich flüssigen Blutkörperchenschicht setzte sich eine klare, dunkelrote Flüssigkeit ab, die sich von den unteren Schichten nicht — wie das bei der ersten Blutprobe möglich war — abgießen, sondern nur abpipettieren ließ. Hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Kaninchenblut aufzulösen, verhielten sich diese Sera, die als P_1 und P_2 bezeichnet werden mögen, im Vergleich zum Serum (S) — die Proben wurden sämtlich mit Kochsalzlösung auf gleiche Mengen gebracht — folgendermaßen:

Tabelle I.

$\frac{1}{2}$ ccm einer 5 proz. Kaninchenblutkörperchen-Aufschwemmung wurde gelöst von:

ccm	S	P_1	P_2
0,00	0	0	00
0,04	Spur	Spürchen	00
0,08	St. Spur	Spürchen Aggl.	Spürchen
0,12	komplett	„ „	inkomplett
0,16	„	inkomplett „	komplett? Grg.
0,20	„	„ Sp. Grg.	„ „
0,24	„	sehr rot Grg.	sehr rot f. ger.
0,28	„	„ „ geron.	„ „ „ „
0,32	„	„ „ „	„ „ geron.
0,36	„	„ „ „	„ „ „
0,40	„	„ „ „	„ „ „

Die Tabelle I zeigt, daß P_1 und P_2 weniger stark hämolytisch auf Kaninchenblutkörperchen wirkten als S, d. h., daß, wie Batelli angibt, die Injektion von Kaninchenblutkörperchen die hämolytische Fähigkeit des Hundeserums herabsetzt; P_1 und P_2 zeigten unter-

einander keinen Unterschied in der Auflösung von Kaninchenblutkörperchen; es erschien demnach zwecklos, mehrere Blutproben nach der Injektion zu entnehmen, und wir begnügten uns in den späteren Versuchen mit einer 20 Minuten nach der Injektion von Kaninchenblut entnommenen Blutprobe. Dabei war der Unterschied zwischen der Wirkung des normalen Serums und der aus der zweiten, schlecht geronnenen Blutprobe erhaltenen Flüssigkeit häufig noch auffälliger, als dies aus der Tabelle I ersichtlich ist. Zur Veranschaulichung hiervon mag der folgende Versuch dienen.

Hund von 4600 g Gewicht erhält 0,023 g Morphin. mur. subcutan. Nach Freilegung der l. Carotis und der r. V. jugularis erfolgt 3^h 8 Entnahme von 30 ccm Blut aus der Carotis. 3^h 18 bis 3^h 24 Injektion von 23 ccm defibrinierten Kaninchenbluts. Nach der Injektion Schmerzäußerung und Dyspnoe. 3^h 42 zweite Entnahme von 30 ccm Blut aus der Carotis. Die zuerst entnommene Blutprobe gerann vollständig und ergab ein klares Serum (*S*); die zweite Blutprobe zeigte fast gar keine Gerinnung. Die nach mehrstündigem Zentrifugieren erhaltene Flüssigkeit (*P*) war stark rot gefärbt und ebenfalls klar und durchsichtig. Auf $^1/_2$ ccm einer 5 proz. Kaninchenblutkörperchenaufschwemmung gebracht, zeigten *P* und *S* folgendes hämolytisches Verhalten:

Tabelle II.

ccm	*S*	*P*	ccm	*S*	*P*
0,00	00	00	0,30	komplett	Spürchen
0,05	00	00	0,35	„	Spur
0,10	Spürchen	00	0,40	„	st. Spur
0,15	inkomplett	00	0,45	„	inkomplett
0,20	komplett	00	0,50	„	komplett
0,25	„	Spürchen	—	—	—

Die Tatsache, daß das nach der Injektion von Kaninchenblut gewonnene, dunkelrot gefärbte Serum Kaninchenblutkörperchen weniger stark hämolysierte als normales Hundeserum, konnte auf verschiedenen Vorgängen beruhen. Daß in der kurzen Zeit zwischen der ersten und der zweiten Blutentnahme die Neubildung von Stoffen stattfand, welche der Auflösung der Kaninchenblutkörperchen entgegenwirkt, war nicht sehr wahrscheinlich, aber immerhin denkbar; es mußte dann das nach Injektion erhaltene Serum (*P*), dem normalen Hundeserum (*S*) zugesetzt, dessen hämolytische Fähigkeiten herabsetzen. Zahlreiche Versuche ergaben jedoch, daß das keineswegs der Fall war. Als Beispiel mag hier der vorstehend beschriebene Versuch dienen. Aus Tabelle II ist ersichtlich, daß

0,2 S $^1/_2$ ccm einer 5 proz. Kaninchenblutkörperchenaufschwemmung komplett löste. 0,2 $S + P$ in steigender Menge von 0,0 bis 1,0 ergab überall komplette Hämolyse. Ebenso ergab 0,2 S + 0,0 bis 1,0 P, das bei 50° inaktiviert worden war, in allen Proben komplette Hämolyse. 1,0 inaktiviertes P allein löste absolut nicht.

Aus diesem Versuch geht hervor, daß die hämolytische Fähigkeit des Hundeserums gegenüber Kaninchenblutkörperchen durch Zusatz von P nicht gehemmt wird.

Da P weniger stark hämolytisch wirkt als S, so war zu erwarten, daß P ein oder beide der zur Auflösung von Kaninchenblutkörperchen notwendigen Stoffe in geringerer Menge enthielt als S. Wenn dies der Fall war, so mußte durch Zusatz eines oder des anderen der zur Hämolyse notwendigen Komponenten (Komplement oder Immunkörper) der hämolytische Effekt von P derartig gesteigert werden können, daß er dem von S gleichkam. Hierzu war eine Komplementlösung zur Reaktivierung inaktivierten Hundeserums notwendig, und als solche wurde zunächst Meerschweinchenserum verwendet und die Versuche wie folgt angestellt.

Morphinisierter Hund von 3500 g; erste Entnahme von 30 ccm Blut 4h 23. 4h 25 bis 4h 30 Injektion von 18 ccm Kaninchenblut in die r. V. jugularis. 4h 50 zweite Entnahme von 30 ccm Blut, S und P wurden auf ihr hämolytisches Verhalten geprüft und ferner zu P steigende Mengen Meerschweinchenserum (MS) zugesetzt. Tabelle III gibt den erhaltenen Befund wieder.

Tabelle III.

ccm	S	P	0,2 P + steig. Mengen MS
0,00	00	00	0,0 Spur
0,05	00	00	0,05 „
0,10	Spur	Spürchen	0,1 inkomplett
0,15	inkomplett	Spur	0,15 „
0,20	komplett	„	0,2 komplett
0,25	„	„	0,25 „
0,30	„	inkomplett	—
0,35	„	„	0,25 MS ohne $P = 0$
0,40	„	„	—
0,45	„	„	—
0,50	„	„	—

Aus diesem Versuch geht hervor, daß es möglich ist, durch Hinzufügung von Komplement mit einer an und für sich nicht komplett lösenden Menge von P komplette Hämolyse zu erzielen.

Das gleiche Resultat ergab eine Reihe in gleicher Weise angestellter Versuche, aus der auch die beiden folgenden erwähnt sein mögen.

Morphinisierter Hund von 8700 g. Erste Blutentnahme 50 ccm 12^h 50. Injektion von 44 ccm defibrinierten Kaninchenblutes 12^h 52 bis 1^h 04. Zweite Blutentnahme 50 ccm 1^h 25. *S* und *P* zeigten folgendes hämolytisches Verhalten.

Tabelle IV.

ccm	*S*	*P*	0,2 *P* + steig. Mengen *MS*
0,0	00	00	0,1 Spur
0,03	00	00	0,2 inkomplett
0,06	Spur	00	0,3 komplett
0,09	inkomplett	00	0,4 „
0,12	komplett	00	0,5 „
0,15	„	00	0,5 *MS* ohne *P* = 0
0,18	„	Spur	—
0,21	„	„	—
0,24	„	inkomplett	—
0,27	„	f. komplett	—

Tabelle V.

Morphinisierter Hund von 3500 g. Erste Blutentnahme 20 ccm 4^h 12. 4^h 15 bis 4^h 20 Injektion von 17 ccm defibrinierten Kaninchenblutes in die r. V. jugularis. 4^h 42 zweite Blutentnahme 20 ccm.

ccm	*S*	*P*	0,25 *P* + *MS* steig. von 0,0 bis 0,3
0,0	00	00	0,0 Spur
0,05	00	00	0,03 „
0,10	Spur	00	0,06 st. Spur
0,15	„	00	0,10 „
0,20	f. komplett	00	0,12 „
0,25	komplett	Spürchen	0,15 inkomplett
0,30	„	Spur	0,18 „
0,35	„	st. Spur	0,21 „
0,40	„	inkomplett	0,24 komplett
0,45	„	„	0,27 „
0,50	„	„	0,30 „

0,27 *MS* ohne *P* = 0.

Es handelte sich nun noch darum, festzustellen, ob durch die Injektion von Kaninchenblutkörperchen nicht nur Komplement, sondern auch Immunkörper in nachweisbarer Menge verbraucht

würden. Dazu war ein Serum nötig, das imstande war, inaktives Hundeserum zur Auflösung von Kaninchenblutkörperchen zu reaktivieren, ohne selbst Kaninchenblutkörperchen aufzulösen. Meerschweinchenserum, das zu den früheren Kompletierungsversuchen gedient hatte, war unbrauchbar, da diejenige Komplementmenge, die zur Aktivierung inaktivierten Hundeserums nötig ist, eine solche Menge Immunkörper enthält, daß das Serum an und für sich imstande ist $^1/_2$ ccm einer 5 proz. Kaninchenblutkörperchenaufschwemmung zu lösen.

Nach zahlreichen mißlungenen Versuchen durch Kältetrennung oder Steigerung des Komplementgehaltes durch Peptoninjektionen aus dem Meerschweinchenblut ein derartiges Serum zu erhalten, erwies sich folgende Methode anwendbar, die schon früher von Sachs[1]) als brauchbar erkannt worden war.

Es wurde das native Serum eines Hundes in starker Verdünnung, gewöhnlich mit der neunfachen Menge Kochsalzlösung — auch ist nicht jedes Hundeserum brauchbar — auf Kaninchenblutkörperchen gebracht und die eintretende Hämolyse beobachtet. Diejenige größte Menge, die $^1/_2$ ccm einer 5 proz. Kaninchenblutkörperchen-Aufschwemmung nicht zu lösen vermochte, war imstande, eine ausreichende Menge inaktivierten Hundeserums zu reaktivieren, enthielt also eine hierzu genügende Komplementmenge und konnte zur Entscheidung der Frage, ob das nach der Injektion vom Kaninchenblut erhaltene Hundeserum noch die gleiche Menge Immunkörper enthielt wie das natürliche, verwendet werden. Die Versuche wurden genau, wie früher angegeben, angestellt und die geringste lösende Menge von S und P ermittelt; in den unten folgenden drei Versuchen war stets der Unterschied zwischen der hämolytischen Fähigkeit von S und P ein recht erheblicher; nach Inaktivierung beider Sera und Zusatz von steigenden Mengen der inaktivierten Sera S und P zu einer ausreichenden Menge normalen Hundeserums ließ sich kein deutlicher Unterschied in der hämolytischen Wirkung mehr nachweisen, wie das aus den Versuchstabellen VI bis VIII hervorgeht.

Diese Versuche zeigten also, daß, wenn überhaupt, nur ein sehr geringer Unterschied zwischen der Immunkörpermenge des vor und nach der Injektion der Kaninchenblutkörperchen gewonnenen Hundeserums besteht; es findet also durch die Injektion

---

[1]) Sachs, H., Über die Hämolysine des normalen Serums. Münchn. med. Wochenschr. 1904, Nr. 7.

Tabelle VI.

ccm	S	P	S inaktiv steig. von 0,0 bis 0,5 + 0,05 HS	P inaktiv steig. von 0,0 bis 0,5 + 0,05 HS
0,0	00	00	00	00
0,05	Spürchen	00	00	00
0,10	Spur	00	Spürchen	00
0,15	komplett	00	Spur	Spur
0,20	—	00	inkomplett	f. komplett
0,25	—	00	komplett	komplett
0,30	—	Spürchen	—	—
0,35	—	"	—	—
0,40	—	"	—	—
0,45	—	Spur	—	—
0,50	—	"	—	—

Tabelle VII.

ccm	S	P	S inaktiv steig. von 0,0 bis 0,3 + 0,07 HS	P inaktiv steig. von 0,0 bis 0,3 + 0,07 HS
0,0	00	00	00	00
0,03	00	00	00	00
0,06	Spur	00	00	Spürchen
0,09	inkomplett	00	Spürchen	Spur
0,12	komplett	00	inkomplett	"
0,15	—	Spürchen	komplett	inkomplett
0,18	—	"	—	komplett
0,21	—	Spur	—	—
0,24	—	"	—	—
0,27	—	"	—	—
0,30	—	inkomplett	—	—

Tabelle VIII.

ccm	S	P	S inaktiv steig. von 0,0 bis 0,5 + 0,1 HS	P inaktiv steig. von 0,0 bis 0,5 + 0,1 HS
0,0	00	00	00	00
0,05	00	00	Spur	Spürchen
0,10	Spur	00	"	"
0,15	inkomplett	00	inkomplett	Spur
0,20	komplett	Spürchen	komplett	inkomplett
0,25	—	"	—	komplett
0,30	—	"	—	—
0,35	—	Spur	—	—
0,40	—	inkomplett	—	—
0,45	—	"	—	—
0,50	—	"	—	—

von Kaninchenblutkörperchen in das Gefäßsystem des Hundes in den angegebenen Mengen, d. h. $^1/_2$ Proz. des Körpergewichts der Hunde entsprechend, mit der Auflösung der Kaninchenblutkörperchen eine Abnahme des Komplementgehaltes, aber keine entsprechende Abnahme des Immunkörpergehaltes des Serums statt. Diese Abnahme der Komplementmenge im Hundeserum läßt sich unschwer auf den bei der Auflösung der Kaninchenblutkörperchen stattfindenden Komplementverbrauch beziehen.

Eine Verminderung der Komplementmenge hat Sachs[1]) bereits als erste Phase der Hämolysinbildung bei der Immunisierung von Kaninchen gegen Rinderblut beschrieben, und Moreschi[2]) und Fleischmann und Michaelis[3]) konstatierten eine solche bei der Injektion von Ziegen- bzw. Rinderserum in die Ohrvene eines Kaninchens, dessen Blutserum ein starkes Präzipitin gegen Ziegen- bzw. Rinderserum enthielt. Wenn auch anzunehmen ist, daß in unseren Versuchen neben dem Komplementverbrauch auch ein Immunkörperverbrauch stattfand, so ist derselbe doch so gering, daß er sich mit unseren Methoden nicht sicher nachweisen ließ.

---

[1]) Sachs, H., Die Vorgänge im Organismus bei der Transfusion körperfremden Blutes. Arch. f. Anat. u. Physiol. 1903.

[2]) Moreschi, C., Zur Lehre von den Antikomplementen. Berl. klin. Wochenschr. 1906, Nr. 4.

[3]) Fleischmann und Michaelis, Über experimentell in vivo erzeugten Komplementschwund. Medizin. Klinik 1906, Nr. 1.

Kürzere Mitteilungen.

1. Zur Frage des Vorkommens zuckerabspaltender Substanzen in der Leber.

Von Dr. **Rudolf Türkel** (Wien).

Ausgeführt unter Leitung des Privatdozenten Dr. Otto v. Fürth, Assistenten am k. k. physiologischen Institut der Universität in Wien.

Nach den Untersuchungen von Seegen [1]) ist der Gesamtkohlehydratgehalt der Leber größer als die Summe von Leberzucker und Glykogen; in der Verfolgung dieser Beobachtung gelangte Seegen zu nachstehenden Resultaten: Hatte er aus dem wässerigen Extrakte der Leber den Zucker und das Glykogen entfernt, so blieb ein Körper in der Flüssigkeit zurück, der sich durch 90 proz. Alkohol fällen ließ, sich als N-haltig erwies, Kupferoxyd in alkalischer Lösung reduzierte und durch Kochen mit Säure in Traubenzucker verwandelt werden konnte. Eine Reindarstellung mißlang. In späteren, gemeinschaftlich mit Neimann ausgeführten Untersuchungen [2]) konnte Seegen diese Mitteilungen nur wenig erweitern. Analysen des gefundenen Körpers ergaben stets einen beträchtlichen Aschengehalt — durchschnittlich 40 Proz. — und zeigten, daß von der durch Alkohol fällbaren Substanz nur ein verschwindender Bruchteil in Form von Dextrose wiedergewonnen werden konnte. Seegen hat trotzdem in den beiden genannten Arbeiten, sowie in weiteren Mitteilungen [3]) die erwähnte Substanz als eine Vorstufe des Zuckers angesprochen, die nur in der Leber zu finden sei; in anderen Organen konnte sie unter keinen Umständen nachgewiesen werden. — Auch Röhmann [4]) und Salkowski [5]) fanden, daß in dem glykogenfreien Leberextrakt ein durch starkes Reduktionsvermögen gegenüber Fehlingscher und Knappscher Lösung charakterisierter Körper vorhanden sei.

---

[1]) Seegen, Arch. f. (Anat. u.) Phys. 1900, S. 292.

[2]) Seegen und Neimann, Sitz.-Ber. d. k. Akad. d. Wiss. in Wien **112**, 3. Abt., 1903.

[3]) Seegen, Wien. med. Wochenschr. 1904, Nr. 7; Arch. f. (Anat. u.) Phys. 1903, S. 425; Zentralbl. f. Physiol. **12** u. **13**.

[4]) Röhmann, Zentralbl. f. d. med. Wiss. 1893, Nr. 51.

[5]) Salkowski, Ebenda Nr. 52.

Mit der Nachprüfung dieser Untersuchungen beschäftigt, gelangte ich zu Ergebnissen, die mit den eben geschilderten nicht im Einklang stehen.

Meine Versuche wurden folgendermaßen angestellt: Ein Hund wurde durch Chloroform zu Tode narkotisiert, die Leber sofort nach eingetretenem Tode herausgenommen, in grobe Stücke geschnitten, in bereit gehaltenes siedendes Wasser gebracht und durch eine halbe Stunde gekocht; sodann zerkleinert und nach dem von Embden und Knoop[1]) zur Enteiweißung von Organextrakten angegebenen Verfahren mit 1 proz. siedender Kaliumphosphatlösung extrahiert. Die Auszüge wurden vereinigt und auf ein kleines Volumen eingedampft. Das nunmehr vorhandene Extrakt wurde zur Entfernung des Glykogens auf 58 bis 60 Proz. Alkoholgehalt gebracht, von dem voluminösen Niederschlage abfiltriert, der Alkohol auf dem Wasserbade verjagt und in der Flüssigkeit der Zuckergehalt durch Titration mit Fehlingscher Lösung bestimmt. Der Rest der Flüssigkeit wurde mit frischer Hefe vergoren, bis sich keine Spur von Reduktion mehr zeigte. Die klare, nunmehr von Eiweiß, Zucker und Glykogen vollständig befreite Lösung, die bald heller, bald dunkler gelb gefärbt war und mit 90 proz. Alkohol überhaupt keine Fällung gab, wurde nunmehr mit konzentrierter Salzsäure (1 : 1) versetzt und nach Zusatz einer geringen Menge Zinnchlorür mehrere Stunden unter Rückflußkühlung erhitzt. Bei unserem ersten Versuche war der Zusatz von Zinnchlorür unterblieben, was zur Folge hatte, daß die Flüssigkeit tief schwarz gefärbt erschien, so daß eine Beurteilung der verschiedenen Reaktionen sehr erschwert war. Das Zinnchlorür wurde durch Schwefelwasserstoff entfernt, das Filtrat wieder auf ein kleines Volumen gebracht, mit Kalilauge neutralisiert und auf einen eventuellen Zuckergehalt untersucht.

Ich habe in der angegebenen Weise vier Versuche ausgeführt, zwei davon an Hunden, die vorher durch eine Woche mit sehr kohlehydratreicher Nahrung gefüttert worden waren.

Niemals konnte ich auch nur die Andeutung einer Reduktion der Fehlingschen Lösung wahrnehmen. Ebenso fiel die Reaktion von Molisch stets negativ aus.

Ich konnte mich also nicht davon überzeugen, daß von Eiweiß, Glykogen und vergärbarem Zucker vollständig befreite Extrakte aus Hundelebern noch erhebliche Mengen einer durch Alkohol fällbaren, bei der Hydrolyse Zucker abspaltenden Substanz enthalten.

---

[1]) Embden und Knoop, Diese Zeitschrift 3, 120.

Beiträge
zur
Chemischen Physiologie
und
Pathologie

Zeitschrift für die gesamte Biochemie

unter
Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben
von
Franz Hofmeister
o. Professor der physiologischen Chemie an der Universität Straßburg

---

IX. Band 3. und 4. Heft
(Ausgegeben Januar 1907)

Braunschweig
Druck und Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn
1907

Inhalt des 3. und 4. Heftes.

Die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie“ erscheinen in zwanglosen Heften, von denen 12 einen Band von etwa 30 Druckbogen zum Preise von M. 15,— bilden.

Die Ausgabe der Hefte erfolgt nach Maßgabe des einlaufenden Materials in kurzen Zwischenräumen. Die Zahl der in einem Jahre erscheinenden Bände soll zwei nicht überschreiten.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Straßburg i. E., Wimpfelingstraße 2, zu richten.

Bei der Aufnahme von Arbeiten in die „Beiträge“ soll in erster Reihe deren biologisches Interesse, sodann Exaktheit der Durchführung, Sachlichkeit, Knappheit und Übersichtlichkeit der Darstellung maßgebend sein. Polemische Ausführungen, welche den Rahmen einer tatsächlichen Richtigstellung überschreiten, können nicht Aufnahme finden. Der kurzen Mitteilung neuer Befunde bleibt ein besonderer Raum vorbehalten. Solchen „kürzeren Mitteilungen“ kann ein besonders rasches Erscheinen zugesichert werden.

Die Mitarbeiter erhalten ein Honorar von M. 40,— für den Druckbogen und 50 Sonder-Abzüge.

VII.

Über den Einfluß der Nahrung auf die Ausscheidung von Gallensäuren und Cholesterin durch die Galle.

Von Dr. **Edward H. Goodman** (Philadelphia).

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

1.

Daß der Gallenfarbstoff durch Umwandlung von Blutfarbstoff in der Leber entsteht, ist allgemein angenommen. Hingegen ist über die Herkunft anderer spezifischer Gallenbestandteile, so namentlich der Gallensäuren, nichts bekannt. Nun setzt die Bildung von Gallenfarbstoff aus Blut den Zerfall einer gewissen nicht unerheblichen Menge von Blutkörperchen voraus, so daß an die Möglichkeit zu denken ist, daß die dabei neben dem Hämatin verfügbar werdenden Bestandteile der Blutkörperchen — Globin, Cholesterin Phosphatide u. a. — bei der Bildung der übrigen spezifischen Gallenbestandteile, vor allem der Gallensäuren, beteiligt sind Namentlich konnte dabei an eine Beteiligung des Cholesterins gedacht werden, einerseits, weil die Cholesterine, soweit Formel und Reaktionen bisher ein Urteil gestatten, der Cholsäure und den homologen Gallensäuren näher stehen als andere im Tierkörper gefundene Stoffe, sodann weil bei gewissen Tierarten (Selachiern) nach Hammarstens Entdeckung die echten Gallensäuren durch die Schwefelsäure-Ester von den Cholesterinen homologen Alkoholen vertreten werden.

Von diesem Gesichtspunkte aus habe ich auf Veranlassung von Prof. Hofmeister bei einem Hunde mit permanenter kompletter Gallenfistel fortlaufende Bestimmungen von Gallensäuren und Cholesterin in der Galle ausgeführt und den Einfluß zunächst der Zufuhr von Blutkörperchen, dann aber auch anderer Nahrung auf die Ausscheidung dieser Stoffe untersucht.

Der Einfluß der Nahrungszufuhr auf die Menge der ausgeschiedenen Galle ist, seit Schwann Gallenfisteln anzulegen lehrte, sehr oft, in den letzten Jahren neuerdings von G. Bruno[1]), A. G. Barbèra[2]), A. Ligati[3]) und N. Klodnizki[4]) untersucht worden. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß die Fette und die peptischen Verdauungsprodukte des Eiweißes als echte Erreger der Gallenabsonderung anzusehen sind. In einem Teile dieser Versuche wurde auch der Trockengehalt der Galle bestimmt und gefunden, daß der Gallenvermehrung eine Steigerung der Konzentration der Galle zu entsprechen pflegt, was auf eine Vermehrung der gallensauren Salze hinweist.

Einen annähernden Schluß auf die Größe der Gallensäurenausscheidung gestattet ferner die Bestimmung des Schwefels in der Galle, zumal da, wo, wie beim Hunde, die Taurocholsäure überwiegt. Nach Kunkel[5]) hat Eiweißzufuhr beim Hunde eine gesteigerte Schwefelausscheidung zur Folge, somit ist auf eine erhöhte Gallensäurebildung zu schließen. Aus P. Spiros[6]) Versuchen ist dasselbe zu entnehmen, ebenso weiter, daß Kohlehydratzufuhr keinen solchen Einfluß hat.

Fortlaufende direkte Bestimmungen der ausgeschiedenen Gallensäuren bei wechselnder Nahrung scheinen nicht vorzuliegen. Hingegen fehlt es nicht an solchen Untersuchungen nach Zufuhr von Galle oder gallensauren Salzen selbst. Besonders wichtig sind in dieser Richtung die Versuche von E. Stadelmann[7]) und von F. Pfaff und A. Balch[8]).

Die Versuche Stadelmanns und seiner Mitarbeiter Nissen, Loewenton, Winteler und Gertner zeigten, daß beim Hunde per os als solche oder in Form von Galle eingeführte gallensaure Salze zu einer sehr erheblichen Mehrausscheidung derselben durch die Galle führen. Dabei erwies sich Hundegalle weniger gallen-

---

[1]) G. Bruno, St. Petersburger med. Wochenschr. 1898, Beil. S. 13. Dissertation 1897/98, referiert im Jahresbericht f. Tierchemie 27, 441.

[2]) A. G. Barbèra, Zentralblatt für Physiologie 12, 652.

[3]) A. Ligati, Magyar Orvosi Archivum 1899, durch Jahresber. f. Tierchemie 1899, S. 422.

[4]) N. Klodnizki, Dissertation, Petersburg; Jahresber. f. Tierchemie 1903, S. 617.

[5]) Kunkel, Arbeiten aus der physiologischen Anstalt zu Leipzig 10, 1875. Pflügers Archiv 14, 344.

[6]) P. Spiro, Dubois-Reymonds Arch. f. Physiol. 1888. Supplementband, S. 50.

[7]) Stadelmann, Zeitschrift f. Biol., N. F. 16, 1 (1896).

[8]) F. Pfaff und A. Balch, Journal of experim. Medicine 2, 49.

treibend als Ochsengalle, andererseits veranlaßte Zufuhr von Taurocholat eine größere Ausscheidung von gallensauren Salzen als Glykocholat. Bei diesen Versuchen wurde wiederholt die Beobachtung gemacht, daß die erhöhte Ausscheidung von gallensauren Salzen nicht sofort abklang, wenn mit der Zufuhr von Galle ausgesetzt wurde, sondern eine tagelang andauernde Nachwirkung zurückließ, die nach Stadelmann möglicherweise auf die nachträgliche Ausscheidung im Körper aufgehäufter Gallensäure, möglicherweise aber auch auf eine dauernde sekretorische Erregung der Leber zu beziehen ist.

Über den Einfluß der Nahrung auf den Cholesteringehalt der Galle liegt eine ausführliche Untersuchung von R. Thomas [1]) vor, die zu dem Schlusse führt, daß ein solcher Einfluß nicht besteht.

2. Methodisches.

Die Bestimmung der gallensauren Salze geschah bisher nach dem Verfahren von Hoppe-Seyler, welches im wesentlichen auf der Extraktion der gallensauren Salze aus der zur Trockne gebrachten Galle mit starkem Alkohol, Fällung des Extraktes mit Äther und Wägung des Niederschlags beruht. Wie jedoch schon Stadelmann fand, hängt die Reinheit der gewogenen Salze sehr stark von der Konzentration des verwendeten Alkohols ab. Bei Benutzung von 95proz. Alkohol kann der zu wägende Rückstand neben gallensaurem Natron sehr erhebliche Quantitäten von fremden, die Pettenkofersche Reaktion nicht gebenden Beimengungen enthalten. Durch doppelte Extraktion, erst mit 95proz. Alkohol mit nachfolgendem Eindampfen und neuerlichem Extrahieren mit absolutem Alkohol, wird dieser Versuchsfehler wenigstens zum Teil vermieden; eine völlige Sicherheit gewährt aber das Verfahren, wie aus den Versuchsangaben von Stadelmann zu ersehen ist, trotz seiner Umständlichkeit nicht. Auf eine andere Fehlerquelle hat erst neuerdings Hammarsten [2]) aufmerksam gemacht. Bei Anwesenheit von Phosphatiden (Lecithin) in der alkoholischen Lösung der Alkalisalze der Gallensäuren können einerseits erhebliche Mengen Lecithin durch Äther mitgefällt werden und so die Menge der Gallensäuren scheinbar erhöhen, andererseits können sehr merk-

---

[1]) R. Thomas: Über Abhängigkeit der Absonderung und Zusammensetzung der Galle von der Nahrung. Dissertation. Straßburg 1890.

[2]) Ergebnisse der Physiologie, her. v. Asher u. Spiro, IV, S. 1, 1905.

liche Mengen der gallensauren Salze in der lecithinhaltigen ätherischen Lösung zurückbleiben und so die analytischen Werte herabdrücken. Da eine Sicherheit über die Reinheit der zur Wägung gebrachten Plattnerschen Galle nur durch jedesmalige genauere Analyse zu erhalten wäre, habe ich von der Verwendung dieses Verfahrens Abstand genommen und zunächst unter Verwendung von Rindsgalle ein Bestimmungsverfahren ausgearbeitet, das sich auf die neueren Erfahrungen zur Isolierung der Cholsäure und Entfernung der Fettsäuren gründet.

50 g Rindsgalle werden mit 125 g 60 proz. Kalilauge versetzt und unter dem Rückflußkühler 24 Stunden im Sieden erhalten. Nach dem Erkalten wird die Lösung behufs Extraktion des Cholesterins im Schütteltrichter fünfmal mit je 75 ccm unter 70° siedenden frisch destillierten Petroläthers ausgeschüttelt, auf dem Wasserbade von dem Reste des Petroläthers befreit, dann abkühlen gelassen und mit 5 proz. Baryumchloridlösung — behufs Entfernung der hohen Fettsäuren — ausgefällt. Dann wird in eine Porzellanschale abfiltriert, der Rückstand auf dem Filter mit kochendem Wasser ausgewaschen und das gesamte Filtrat auf 200 bis 300 ccm eingeengt, quantitativ in ein Becherglas gespült und hier unter starkem Kühlen mit Eis und Salz behufs Ausfällung der Cholsäure mit Salzsäure bis zu stark saurer Reaktion versetzt. Als passende Konzentration der Säure hat sich mir bei vielfach wiederholten Versuchen eine Mischung von 50 ccm rauchender Salzsäure mit 100 ccm Wasser erwiesen. Wählt man die Konzentration stärker, so scheidet sich die Cholsäure als schwer zu behandelnder zäher, klumpiger Niederschlag aus. Ist die Säure zu verdünnt, z. B. unter 10 Proz., so führt die Neutralisation zu einem allzu großen Flüssigkeitsvolum, was wieder im Hinblick auf die immerhin nicht zu vernachlässigende Löslichkeit der Cholsäure (1 : 4000) zu vermeiden ist. Das Hinzufügen der Salzsäure muß überdies allmählich, unter Vermeidung merklicher Temperaturerhöhung, geschehen. Ist die Abscheidung anscheinend vollendet, so läßt man noch zwei Stunden bei Zimmertemperatur stehen, bringt dann den bröckelig-körnigen Niederschlag aufs Filter und wäscht aus. Das Filter wird nun getrocknet und im Soxhletapparat mit wasserfreiem Aceton extrahiert, wobei als Sammelgefäß ein gewogenes Erlenmeyerkölbchen dient. In etwa 5 Stunden ist alle Cholsäure übergegangen. Man verjagt das Aceton und wägt den auf Gewichtskonstanz gebrachten Rückstand.

Diese Art, die Cholsäure zur Wägung zu bringen, hat sich mir in mannigfachen mit Cholsäure und mit Rindsgalle angestellten Vorversuchen als die zweckmäßigste bewährt. Da die Cholsäure im Wasser nicht ganz unlöslich ist, erleidet man beim Waschen einen kleinen Verlust, der sich bei den von mir in den nachfolgenden Versuchen gewogenen Cholsäuremengen auf etwa 5 Proz. der Gesamtmenge schätzen läßt. Andererseits erhält man die zu wägende Substanz blaßgrün gefärbt, da das absolute Aceton etwas

Gallenfarbstoff aufnimmt. Doch dürfte es sich da nur um unwägbare Mengen handeln.

Andere Versuche zur quantitativen Bestimmung der ausgefällten Cholsäure führten nicht zum Ziele. Erwähnt sei, daß der Versuch, die Cholsäure in einer gemessenen Menge $^1/_{10}$ n-Lauge zu lösen und diese Menge durch Zurücktitrieren zu bestimmen, daran scheiterte, daß der Cholsäureniederschlag, alles Auswaschens mit Wasser ungeachtet, wechselnde Mengen von Säure zurückhielt.

Das anfangs erhaltene cholesterinhaltige Petrolätherextrakt wurde, behufs Entfernung wasserlöslicher Verunreinigungen, mit Wasser geschüttelt, dann in einem kleinen gewogenen Erlenmeyerkölbchen durch Destillation eingeengt und schließlich als kristallinischer Rückstand bei 100° getrocknet und gewogen. Kontrollversuche mit gewogenen, zu Natriumcholatlösung gesetzten Cholesterinmengen gaben sehr befriedigende Zahlen.

Die Anwendung des an Rindsgalle ausgearbeiteten Verfahrens auf Hundegalle hatte insofern Schwierigkeiten, als hier das Ausschütteln der mit Kalilauge verseiften Galle mit Petroläther zur Bildung einer äußerst beständigen Emulsion führte. Doch konnte durch Zusatz von etwas absolutem Alkohol stets völlige Klärung erzielt werden. Da aber Cholesterin in wasserhaltigem Alkohol nicht unlöslich ist, wurde der abgehobene alkoholhaltige Petroläther nicht direkt mit Wasser gewaschen, sondern zunächst neuerlich eingedampft und erst der Rückstand wieder mit Petroläther aufgenommen, was jetzt ohne Emulsionsbildung vonstatten ging. Die Bestimmung des Cholesterins wurde dann durch Eindampfen in einem gewogenen Erlenmeyerkölbchen wie gewöhnlich zu Ende geführt.

Als Versuchstier diente ein $4^1/_2$ kg schweres Hündchen, bei dem am 7. Mai unter Morphium-Äthernarkose eine permanente Gallenfistel nach Dastre[1]) angelegt wurde[2]). Die Aufsammlung der Galle in einem am Halse befestigten Gummibeutel erwies sich als durchaus zweckmäßig.

Als Futter diente nach einer Periode von Vorversuchen Spratts Hundekuchen, der sich wegen seines geringen Fettgehalts empfahl, und der vom Tiere stets sehr gern genommen wurde. Er wird angeblich aus Mehl, Knochen und Fleisch hergestellt und ergab bei einer Reihe von Stickstoffbestimmungen einen mittleren Stickstoffgehalt von 3,75 Proz. Vom 22. Mai ab erhielt das Tier davon täglich außer an den Versuchstagen 266 g, entsprechend etwa 10 g Stickstoff.

Die Galle wurde jeden Tag um 12 Uhr mittags aus dem Halsbeutel entleert. Unmittelbar darauf wurde dem Hunde das gewählte Futter gereicht.

---

[1]) Arch. de physiol. 22, 714 (1890).

[2]) Herrn Dr. A. Bookman bin ich für seine freundliche Beihilfe zu bestem Danke verpflichtet.

3. Versuche.

Nachstehend gebe ich das Ergebnis der Versuche mit Übergehung der orientierenden Vorversuche in graphischer Form wieder. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Menge des aufgenommenen Futters bis zum 21. Juni nicht genau bestimmt ist.

Das Tier erhielt am 18. Juni eine nicht bestimmte Menge Hundekuchen, am 19. 220 g Blutkörperchen aus zentrifugiertem Pferdeblut (mit etwa 10 g N); am 20. Juni 220 g Hundekuchen, dann vom 21. Juni bis 25. Juli stets 266 g Hundekuchen (= 10 g N) mit Ausnahme bestimmter Tage, wo die Kost folgende war:

am 22. Juni: 294 g mageres Fleisch (= 10 g N);
am 25. Juni: 217 g Blutkörperchenbrei vom Pferd (= 10 g N). Das Tier fraß ihn nur mit Widerwillen;
am 28. Juni: 715 g koaguliertes feuchtes Eierklar (= 13 g N);
am 3. und 4. Juli: koaguliertes Pferdeserum, von dem das Tier nur einen kleinen Teil verzehrte. Nachdem das Tier am 5. Juli anstandslos die gewöhnliche Menge, 266 g, Hundekuchen verzehrt hatte, erhielt es
am 6. Juli: 870 g koaguliertes Eierklar (= 15 g N) unter Zusatz von ganz wenig Milch;
am 9. Juli wurde neben 266 g Hundekuchen 0,5885 Cholsäure gereicht;
am 13. Juli: 294 g mageres Fleisch (= 10 g N);
am 18. Juli: 488 g gekochtes Kalbshirn (= 10 g N).

Der Einfluß der wechselnden Nahrung ist am besten aus den beistehenden Kurven zu ersehen [1]).

A. Gallenmenge.

Wie aus Fig. 1 zu entnehmen, entspricht in der Periode vor der Einführung von Cholsäure (am 9. Juli) der Zufuhr von Blutkörperchen, Fleisch und Eiereiweiß eine Erhöhung der ausgeschiedenen Menge. Da an den Zwischentagen die gleiche Menge Hundekuchen gereicht wurde, so bedeutet das, daß die genannte eiweißreiche Kost auf die Sekretion stärker anregend wirkte als die Hundekuchen. Es entspricht das im allgemeinen der oben

---

[1]) Der Übersichtlichkeit wegen ist dabei der Tag immer von Mittag bis Mittag gerechnet, so daß die mittags gereichte Kost und die zugehörige 24stündige Gallenausscheidung auf dasselbe Datum fallen.

mitgeteilten Erfahrung von der cholagogen Wirkung der per os eingeführten Eiweißstoffe, wobei bemerkt sei, daß das Tier sie keinesfalls den Hundekuchen vorzog [1]).

Außerordentlich deutlich tritt der Einfluß der am 9. Juli zugeführten 0,5885 g Cholsäure hervor [2]), wie nach den oben mitgeteilten Erfahrungen von Stadelmann, Pfaff und Balch u. a.

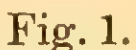
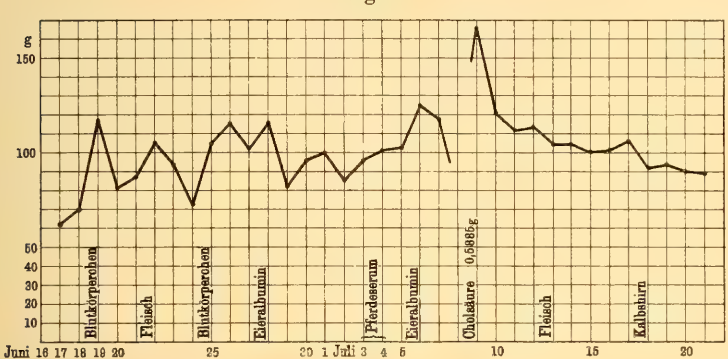


Fig. 1.



Tagesmenge der Galle.

zu erwarten war. Bemerkenswert ist dabei die bereits von Stadelmann bemerkte Nachwirkung, der zufolge die Gallenmenge nur allmählich das frühere Niveau erreicht. Vielleicht liegt in ihr der Grund, daß sich in diesem Stadium die cholagoge Wirkung des Fleisches kaum mehr geltend macht.

B. Cholsäure.

Wie für die erste Versuchsperiode (vom 18. Juni bis 8. Juli) aus Fig. 2 zu entnehmen, hat die Nahrung einen sehr ausgesprochenen Einfluß auf die Menge der ausgeschiedenen Cholsäure. Die Tagesmenge hält sich an den Tagen, wo ausschließlich Hundekuchen gereicht wurde, meist beträchtlich unter 0,6 g, nach Zufuhr von Blutkörperchenbrei, Fleisch, Eierklar steigt sie über diese Grenze bis zu 0,8 und 0,9 pro Tag, wobei anscheinend öfter eine Nachwirkung über die ersten 24 Stunden hinaus erkennbar ist. Wenn Eierklar besonders wirksam erscheint, so dürfte dies damit zusammenhängen,

[1]) Die Darreichung von Pferdeserum am 3. und 4. Juli zeigt nur geringen Einfluß. Wie oben bemerkt, war davon nur wenig verzehrt worden.

[2]) Leider muß ich die auf den 8. Juli entfallende sehr niedrige Zahl, da sie mir unverläßlich scheint, ausfallen lassen.

daß von diesem reichlichere Mengen genossen wurden als von Fleisch und zum Teil auch von Blutkörperchen.

Daß die Cholsäurezufuhr (am 9. Juli) zu einer entsprechenden Mehrausscheidung führen dürfte, war zu erwarten. Schlägt man die sonst ausgeschiedene Cholsäuremenge zu 0,5 bis 0,6 g pro Tag an, so ergibt sich in den ersten 24 Stunden mit 1,1721 g Cholsäure, ein der gesamten per os zugeführten Menge (0,5885) entsprechendes Plus. Wenn sich trotzdem an den nächsten Tagen die Cholsäure weit über dem Mittel hält, so kann es sich nicht mehr um Ausscheidung eines im Körper zurückgebliebenen Restes der eingeführten Menge handeln, sondern um vom Organismus selbst beigestellte, wahrscheinlich neugebildete Substanz. Der Verlauf der Cholsäureausscheidung ist übrigens in dieser Periode (nach dem 9. Juli) weniger regelmäßig als vorher, namentlich vermag ich

Fig. 2.

Cholsäure.

für das Maximum am 15. Juli keine Erklärung zu geben. Dadurch verliert auch die Steigerung der Cholsäureausscheidung nach der Fleischfütterung am 13. und der Zufuhr von Kalbshirn am 18. einigermaßen an Beweiskraft.

Obgleich ein gewisses Parallelgehen von Gallen- und Cholsäuremenge bei Vergleich von Fig. 1 und Fig. 2 namentlich für die erste Versuchsperiode nicht zu verkennen ist, so ist doch die Annahme, daß die Tagesmenge der Cholsäure nur wegen erhöhter Gallenausscheidung gesteigert ist, durch den Umstand ausgeschlossen, daß die Konzentration an Cholsäure mit überraschender Regelmäßigkeit den Schwankungen der Tagesmenge folgt, d. h. steigt die Menge der Galle auf das Doppelte, so steigt auch der Gallensäuregehalt nahezu auf das Doppelte. Die Mehrausscheidung der Cholsäure ist somit nicht an die Vermehrung der Galle bzw. an erhöhte Wassersekretion gebunden, sie kann einfach durch Erhöhung

der Konzentration der Galle zustande kommen. Wasser- und Cholsäureausscheidung durch die Galle sind somit nicht von denselben Bedingungen abhängig, was ja auch nach der von Brand[1]) u. a. nachgewiesenen Stabilität des osmotischen Druckes bei wechselndem Gehalt an festen Stoffen zu erwarten war. Eine beachtenswerte Erscheinung bildet demgegenüber die geringe Konzentrationssteigerung an dem Cholsäuretag. Hier ist eine sehr starke Gallenvermehrung gegeben, mit der die Konzentrationssteigerung nicht gleichen Schritt hält[2]).

C. Cholesterin.

Die Ausscheidung des Cholesterins verläuft, wie aus einem Vergleich von Fig. 2 und 3, namentlich in betreff der ersten Versuchsperiode, hervorgeht, wie jene der Cholsäure; sie ist nach Zufuhr von eiweißreicher Nahrung erheblich gesteigert[3]). Obgleich die Menge des Cholesterins etwa 13 mal kleiner ist als jene der

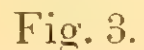
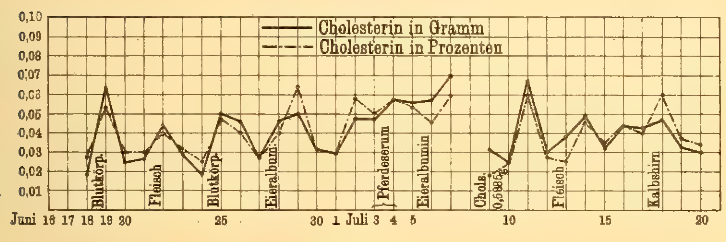


Fig. 3.



Cholesterin.

Cholsäure, so geht doch der prozentische dem absoluten Gehalt nahezu parallel. Man darf aus diesem Zusammentreffen schließen, daß die Bedingungen, von denen die Sekretion dieser beiden wichtigen Gallenbestandteile abhängt, unter den in dieser Versuchs-

---

[1]) Pflügers Arch. 90, 491.

[2]) Eine eingehende Beurteilung dieser Verhältnisse ist im vorliegenden Falle durch das Fehlen sicherer Bestimmungen am Vortage der Cholsäurezufuhr und durch den unregelmäßigen Verlauf der Sekretionskurve in der ganzen zweiten Versuchsperiode sehr erschwert, so daß ich auf diesen Punkt nicht weiter eingehen möchte. Eine Wiederholung dieser Versuchsreihe war mir, so erwünscht sie mir scheint, aus äußeren Gründen nicht möglich.

[3]) Daß Thomas (Dissertation 1893) einen Einfluß der Nahrung auf die Cholesterinausscheidung nicht beobachtet hat, dürfte an seiner Versuchsanordnung liegen, zumal da er nicht die ganze tägliche Gallenmenge, sondern nur die $1\frac{1}{2}$- bis 8stündige zu untersuchen in der Lage war.

periode gegebenen — annähernd normalen — Verhältnissen die gleichen sind.

Daß die Ausscheidung des Cholesterins nicht von der Gallenmenge abhängig ist, geht aus dem Cholsäureversuch hervor, wo bei sehr gesteigerter Gallenmenge die Cholesterinausscheidung zunächst nicht verändert ist, prozentisch sogar unter den Durchschnitt herabgeht.

Beachtenswert ist die Erhöhung der Cholesterinausscheidung unter dem Einfluß des Genusses von Kalbshirn.

Fassen wir die gemachten Beobachtungen von dem eingangs hervorgehobenen Gesichtspunkt — ob das Cholesterin etwa eine unmittelbare Vorstufe der Cholsäure ist — ins Auge, so kommen wir zu einem ablehnenden Urteil. Hirnsubstanz, die über zwei Prozent ihres Gewichts an Cholesterin aufweist, veranlaßt keine stärkere Cholsäureausscheidung als Eierklar, das nur Spuren davon enthält.

Freilich besteht bei allen Fütterungsversuchen der Einwand zu Recht, daß möglicherweise die Resorption des verfütterten Cholesterins eine ungenügende war. Aus diesem Grunde habe ich auch Versuche mit direkter Einverleibung von mit Eiweiß und Lecithin gelöstem Cholesterin in die Blutbahn gemacht.

Schwierigkeiten bereitete dabei die Überführung des wasserunlöslichen Cholesterins in eine Form, in der es ohne Gefahr von Embolien ins Blut injiziert werden konnte. Es gelang, diese Schwierigkeit in folgender Art zu überwinden. $^1/_4$ g Cholesterin und die etwa vierfache Menge Lecithin werden in 95proz. Alkohol gelöst und die Lösung in einer Porzellanschale verdunsten gelassen. Der Rückstand wird dann mit dem Weißen von einem Ei, das mit 0,9proz. Kochsalzlösung verdünnt ist, innig verrieben und das Ganze mit physiologischer Kochsalzlösung auf 200 ccm gebracht und nach Zusatz von etwas (0,05 g) Natriumcarbonat durch anhaltendes Schütteln in eine Emulsion verwandelt. Diese Emulsion setzte beim Stehen eine weiße Masse ab, die keine Cholesterinkristalle enthielt und leicht wieder in Emulsion zu bringen war.

Vorversuche mit solcher Emulsion ergaben, daß sie bei langsamer intravenöser Injektion (etwa 200 ccm in der Stunde) keinerlei Erscheinungen veranlaßte. In einem solchen Versuch enthielten 34 g vor dem Versuch gesammelter Galle 0,3579 g Cholsäure gegen 0,2082 g, die in 38 ccm nach der Operation entleerter Galle enthalten waren. Auch der Cholesteringehalt zeigte eine Abnahme. Ein zweiter ähnlicher Versuch wurde an dem von mir benutzten Gallenfistelhund ausgeführt. Die Injektion von 0,2515 g Cholesterin und 1,009 g Lecithin wurde gut vertragen. Das Tier nahm fast einen Tag lang danach kein Futter, erholte sich aber am zweitnächsten völlig. Die Tagesmenge der nach der Injektion erhaltenen Galle war nicht

erhöht (63 g), ebensowenig die ausgeschiedene Menge der Cholsäure (0,32 g) und des Cholesterins (0,025 g).

Obgleich hier eine nicht unerhebliche Menge Cholesterin direkt dem Blut einverleibt wurde, war ein Einfluß auf die Cholsäure- und Cholesterinausscheidung nicht wahrnehmbar. Danach kann man nicht wohl annehmen, daß das Cholesterin eine Vorstufe darstellt, die durch die Tätigkeit der Leber leicht in Cholsäure übergeführt wird. Da die Bildung von Cholsäure aus Cholesterin, soweit sich aus der Formel entnehmen läßt, durch eine Reihe von Zwischenstufen erfolgen müßte, ist natürlich damit nicht ausgeschlossen, daß die Cholsäure in letzter Instanz doch aus dieser Quelle stammt.

IV.

Im Hinblick darauf lohnt es sich, die eingangs berührte Frage, ob die Cholsäure aus dem Cholesterin der Blutkörperchen stammen kann, genauer zu prüfen. Ich verdanke die nachstehende Überlegung Herrn Prof. Hofmeister.

Nach den Erfahrungen an Menschen mit Gallenfisteln beträgt die täglich ausgeschiedene Gallenmenge etwa 500 bis 1100 ccm [1]) mit etwa 0,2 bis 0,7 g Bilirubin. Nimmt man die Menge des pro Tag ausgeschiedenen Bilirubins im Mittel zu 0,5 g an und überlegt ferner, daß 1 g Hämatin nicht mehr als 1 g Bilirubin liefern kann, daß ferner 100 g Hämoglobin etwa 4 g Hämatin entsprechen, so ergibt sich, daß zur Entstehung von 0,5 g Bilirubin das Hämatin von 12,5 g Hämoglobin, d. h. das Hämoglobin von etwa 90 g Blut, benötigt wird. Somit müßten täglich die Blutkörperchen von etwa 90 ccm Blut, mehr als 2 Proz. des gesamten Körpervorrats, zerfallen. Da das normale Auftreten des Hämatoporphyrins im Harn zeigt, daß das Hämatin noch in anderer Richtung als über Bilirubin abgebaut wird, auch durchaus nicht ausgeschlossen werden kann, daß das Hämatin im Körper noch in anderer Art verändert wird, so können obige Zahlen nur Minimalzahlen sein, und der tägliche Blutzerfall muß eher höher veranschlagt werden. Kann nun das bei diesem Blutzerfall frei werdende Cholesterin der Blutkörperchen das alleinige Material der Cholsäurebildung sein? Schlägt man den Cholesteringehalt von 90 g Menschenblut sehr hoch, mit 0,2 Proz., an, so könnte daraus nicht einmal 0,2 g Cholsäure hervorgehen, eine Quantität, die hinter

[1]) J. Brand, Pflügers Arch. 90, 491.

der täglich in der Menschengalle zur Ausscheidung kommenden mindestens um das 30fache zurückbleibt, selbst wenn man die niedrigen Werte, wie sie bei kompletter Gallenblasenfistel erhalten werden, zugrunde legt. Obige Erklärung würde also einen sehr viel größeren, geradezu enormen Blutzerfall von etwa 60 Proz. der gesamten Blutmenge pro Tag voraussetzen, eine Vorstellung, die wohl keine Anhänger finden dürfte.

Zu ähnlichen Resultaten führt die Überlegung, wenn man die bei meinem Versuchstier gegebenen Verhältnisse zugrunde legt.

Da das Tier täglich etwa 0,5 bis 0,6 g Cholsäure bildete, so hätte es dazu etwa der gleichen Menge Cholesterin bedurft. Da Hundeblut etwa 0,1 Proz. Cholesterin enthält, würde das den täglichen Zerfall von 500 bis 600 ccm Blut voraussetzen, d. h. von fast doppelt so viel Blut, als das 4500 g schwere Tier überhaupt besaß.

An eine Herleitung der Cholsäure aus dem Cholesterin des Blutes ist sonach überhaupt nicht zu denken, und bei dem geringen Cholesteringehalt der Nahrung und der Gewebe wird es zweifelhaft, ob das Cholesterin überhaupt, das des gesamten Organismus und der Nahrung zusammengenommen, als ausschließliches oder doch wesentliches Bildungsmaterial der Cholsäure angesehen werden darf. Mit aus diesem Grunde wurde auch der Versuch mit Kalbshirn ausgeführt, weil sich unter den Bestandteilen des Hirns hochmolekulare Säuren, wie die Cerebronsäure ($C_{25}H_{50}O_3$), finden, an die als mögliche Vorstufe der Cholsäure gedacht werden könnte. Das Ergebnis des einen ausgeführten Versuches dürfte auch diese Vorstellung nicht stützen, da die Gallensäurevermehrung nach Genuß von Kalbshirn nicht größer war als nach Zufuhr anderen eiweißreichen Futters.

Die Steigerung der Cholsäurebildung nach Zufuhr von eiweißreicher Nahrung kann sonach nicht einfach als Folge der Zufuhr von Cholesterin aufgefaßt werden. Vorläufig kann man, unter Zurückstellung der chemischen Beziehungen, nur von einer sekretorischen Erregung der Leberzellen unter dem Einfluß der Eiweißzufuhr sprechen, wobei zunächst zu erwägen bleibt, ob die Erregung auf nervösen Bahnen, durch einen Reflex vom Darme her, vermittelt wird oder dadurch, daß bestimmte, in die Leber gelangende Verdauungsprodukte hier einen sekretorischen Reiz ausüben. Die mehrfach gemachte Beobachtung der Nachhaltigkeit einer solchen Wirkung scheint die letztere Vorstellung zu stützen.

Auch die der Cholsäureausscheidung parallel gehende Steigerung der Cholesterinzufuhr wird man als Folge einer sekretorischen Mehrleistung der Leberzellen aufzufassen haben. Wenigstens ist auch hier eine direkte Abhängigkeit von dem Cholesteringehalt der Nahrung nicht erkennbar. Die Leber, die selbst nicht unerhebliche Mengen Cholesterin enthält, vermag den immerhin geringen Mehrbedarf zunächst aus ihrem Vorrat zu liefern. In welcher Weise sie aber diesen Vorrat immer wieder ergänzt, bleibt ebenso wie die Herkunft der Cholsäure eine offene Frage.

Auszug aus dem Versuchsprotokoll.

Datum Juni:	Galle g	Cholsäure g	Cholesterin g	Cholsäure Proz.	Cholesterin Proz.	Bemerkungen
18.	70	0,3490	0,0188	0,499	0,027	
19.	118	0,8227	0,0653	0,697	0,054	220 g Blutkör-
20.	81	0,5033	0,0245	0,621	0,030	perchenbrei
21.	87	0,4736	0,0263	0,544	0,030	
22.	105	0,6610	0,0435	0,630	0,041	294 g mageres
23.	92	0,5557	0,0293	0,604	0,032	Fleisch
24.	73	0,3058	0,0185	0,419	0,025	
25.	105	0,5901	0,0498	0,562	0,047	217 g Blutkör-
26.	115	0,6483	0,0462	0,564	0,040	perchenbrei
27.	103	0,4143	0,0278	0,434	0,027	
28.	115	0,8126	0,0464	0,707	0,040	725 g koagul.
29.	82	0,1845	0,0526	0,225	0,064	Eiereiweiß
30.	97	0,4772	0,0310	0,492	0,032	
Juli:						
1.	100	0,4440	0,0300	0,444	0,030	
2.	83	0,3962	0,0481	0,477	0,058	
3.	96	0,5923	0,0480	0,616	0,050	143 g koagul.
4.	101	0,4488	0,0586	0,444	0,058	Pferdeserum
5.	103	0,4810	0,0562	0,467	0,055	
6.	124	0,8348	0,0570	0,673	0,046	870 g koagul.
7.	118	0,9395	0,0705	0,796	0,060	Eiereiweiß
8.	—	—	—	0,452	0,069	
9.	165	1,1721	0,0311	0,710	0,019	0,5885 g Chol-
10.	121	0,9346	0,0255	0,772	0,024	säure
11.	112	0,8456	0,0672	0,755	0,060	
12.	113	0,6265	0,0316	0,558	0,028	
13.	105	0,8280	0,0378	0,789	0,026	294 g Fleisch
14.	105	0,7030	0,0483	0,670	0,046	
15.	101	0,9613	0,0322	0,952	0,033	
16.	101	0,9110	0,0434	0,902	0,043	
17.	106	0,6750	0,0424	0,636	0,040	
18.	92	0,7462	0,0458	0,822	0,060	488 g Kalbs-
19.	94	0,5508	0,0339	0,586	0,037	gehirn
20.	91	0,5305	—	0,583	—	
21.	90	0,5364	0,0315	0,596	0,035	

VIII.

Über die Bindungsweise des Kreatins im Muskel.

Von Dr. **Fumichiko Urano** (aus Nagasaki).

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

1.

Wie bekannt, enthält der Muskel des Warmblüters konstant nicht unerhebliche Mengen von Kreatin[1]). Der Gehalt daran kann auf Grund der von van Hoogenhuyze und Verploegh[2]) ausgeführten Bestimmungen zu rund 0,4 Proz. angesetzt werden; das bedeutet, wenn man die Summe der Skelettmuskulatur zu rund 40 Proz. anschlägt, einen Gehalt von 1,6 g pro Kilogramm Lebendgewicht. Ein Mensch von 60 kg würde danach in seinen Muskeln 90 bis 100 g Kreatin beherbergen[3]).

Nun ist das Kreatin und ebenso das Kreatinin ein leicht dialysierender Körper. Bedenkt man, daß die Muskelfasern mit der umgebenden Lymphe und dem durchströmenden Blute in einem überaus raschen Stoffaustausch stehen, daß sonach das Sarkolemm zur Aufnahme und Abgabe dialysabler Stoffe in höchstem Maße befähigt sein muß, so befremdet es, daß das Kreatin aus den Muskelschläuchen nicht einfach durch den Flüssigkeitsstrom ausgespült und der Niere zugeführt wird, zumal, da das Blut keinen oder einen viel geringeren Kreatingehalt aufweist. In der Tat ist die durch den Harn ausgeschiedene Menge von Kreatinin und

---

[1]) Beziehungsweise in bestimmten Fällen Kreatin und Kreatinin. Der Einfachheit halber wird im nachstehenden nur vom Kreatin des Muskels gesprochen, obgleich bei den quantitativen Bestimmungen etwa vorhandenes Kreatinin mitbestimmt wurde.

[2]) Zeitschrift f. physiol. Chemie **46**, 433 (1905).

[3]) Obige Prozentzahl zu 0,4 ist mit Folins Verfahren ermittelt. Sie ist etwa doppelt so hoch, als man auf Grund älterer Bestimmungen annahm. Da in Menschenmuskeln mit den älteren, zu niedrige Werte ergebenden Verfahren, etwa 0,3 Proz. Kreatin gefunden worden sind, dürfte die Zugrundelegung der obigen Zahl eher eine zu niedrige Schätzung bedeuten.

Kreatin (beim Menschen etwa 1,5 bis 2,0 g[1]) stets gering im Vergleich zu dem vorhandenen Vorrat, wobei noch zu bedenken ist, daß neben den Muskeln auch die anderen Organe nicht zu vernachlässigende Kreatinmengen enthalten. Jedenfalls ist dieses Verhalten des Kreatins schwer mit der älteren Vorstellung in Einklang zu bringen, wonach es ein Abbauprodukt sein soll. Vielmehr weist es darauf hin, daß das Kreatin ein wesentlicher notwendiger Bestandteil des Muskelprotoplasmas ist.

Wenn nun das Kreatin, trotz seiner großen Fähigkeit durch Membranen zu gehen, im Muskelprotoplasma so festgehalten wird, daß es nicht an das vorbeiströmende Blut abgegeben wird, so kann das entweder darin begründet sein, daß das Sarkolemm für das Kreatin undurchlässig ist, oder aber es ist anzunehmen, daß im Muskelprotoplasma gar nicht das Kreatin als solches, sondern in Form einer nicht dialysablen, also ungelösten oder kolloidalen, Verbindung vorhanden ist.

Daß nun das Sarkolemm, das für die Nähr- und Abfallstoffe des Muskelprotoplasmas — für Sauerstoff, Kohlensäure, Salze, Zucker, Milchsäure u. a. — äußerst durchlässig sein muß, gerade dem Kreatin gegenüber eine semipermeable Membran darstellen sollte, ist eine wenig ansprechende Vorstellung. Andererseits setzt die andere Auffassung, wonach das Kreatin im Muskel gewissermaßen gebunden wäre, notwendig voraus, daß es sich um eine äußerst leicht zerfallende Verbindung handelt, da es ja unschwer gelingt, aus dem frischen Muskel durch einfaches Auskochen sämtliches Kreatin auszuziehen.

Um die Zulässigkeit dieser Vorstellungsreihen zu prüfen, habe ich, durch Herrn Prof. Hofmeister veranlaßt, eine Anzahl Versuche ausgeführt, die feststellen sollten, ob sich frischer unversehrter Muskel unter Bedingungen, die jenen des Lebens nahestehen, in bezug auf Abgabe des Kreatins durch Osmose anders verhält, als wenn er abgestorben oder mechanisch bzw. chemisch verändert ist.

Zu diesem Zwecke habe ich einerseits unversehrten Muskel, andererseits Muskelbrei und auch Muskelpreßsaft unter wechselnden Bedingungen der Dialyse unterworfen und den Übertritt des Kreatins in das Außenwasser erst qualitativ, dann quantitativ verfolgt.

Es kamen nur Muskeln von frischgetöteten Tieren (Kaninchen und Hunden) zur Verwendung.

---

[1]) van Hoogenhuyze und Verploegh, a. a. O.

Um den Austritt des Kreatins aus intakten Muskeln zu untersuchen, wurden diese von Fett, Sehnen und Aponeurosen vorsichtig, soweit möglich, befreit, dann in Streifen zerlegt und diese zu etwa 10 cm langen, etwa 1 cm dicken Bündeln vereinigt, die an den beiden Enden (den Schnittstellen) fest umschnürt wurden. Eine Anzahl solcher „Fleischbündel" von dem in den Versuchsprotokollen angegebenen Gewicht wurde in die Dialysierflüssigkeit eingesenkt. Als osmotisch wirksame Membran kamen sonach bei dieser Anordnung nur die Gewebsmembranen selbst, wesentlich somit das Sarkolemm, in Betracht.

Muskelbrei wurde aus von Fett, Sehnen und sonstigem Bindegewebe wie oben befreiten Muskeln durch Hacken hergestellt. Der feine Brei wurde mit etwas Dialysierflüssigkeit angerührt, in unten geschlossene Schilfschläuche eingefüllt und in diesen nach Zubinden des oberen Endes, ähnlich wie die Fleischbündel, in das Dialysiergefäß hineingehängt. In diesem Falle kam für die Osmose ausschließlich die Wand der Schilfschläuche in Betracht.

Dieselbe Anordnung wurde auch bei den Versuchen mit Preßsaft gewählt. Die Darstellung des Preßsaftes geschah mit Buchners Presse in üblicher Weise. Naturgemäß nahmen hier die vorbereitenden Manipulationen mehr Zeit in Anspruch, als bei der sonst eingehaltenen Versuchsanordnung.

Als Dialysiergefäße dienten etwa 250 ccm fassende Bechergläser. Sie standen während des Versuches im Eiskasten. Da die störende Wirkung der Antiseptica vermieden werden mußte, wurde von ihnen abgesehen. Bakterielle Veränderung der Proben kam nicht zur Wahrnehmung. Namentlich war die Dialysierflüssigkeit nach dem Versuch nicht getrübt. Übrigens liegt, wie aus den Protokollen hervorgeht, das Hauptgewicht der Versuche auf den Diffusionsvorgängen der ersten Stunden, wo sich die Beimengung der Bakterien — die speziell bei Darstellung des Fleischbreies nie absolut auszuschließen ist — noch nicht geltend machen kann.

Zum Nachweis des vom Muskel durch Dialyse abgegebenen Kreatins wurde die Dialysierflüssigkeit in bestimmten Zeitabständen erneuert, die abgegossene Flüssigkeit erst auf dem Wasserbade zur Trockne eingeengt, dann behufs Überführung von Kreatin in Kreatinin mit verdünnter Salzsäure und Wasser versetzt, anhaltend auf dem Wasserbade digeriert und schließlich völlig eingedampft. Ich hielt mich dabei im ganzen an Folins[1]) Angaben. Auf das Vorhandensein des so resultierenden Kreatinins wurde qualitativ mit der Weylschen, Jafféschen und der Chlorzinkreaktion geprüft. Zur annähernden quantitativen Ermittelung diente mir in Ermangelung eines geeigneten Kolorimeters ein Verfahren, bei dem die Intensität der Färbungen verglichen wurde, die einerseits Kreatininlösungen von

---

[1]) Zeitschrift f. physiol. Chemie **41**, 223.

bekanntem Gehalt, andererseits die auf ein bestimmtes Volumen gebrachten, mit Säure eingedampften Dialysierflüssigkeiten bei der Jaffé'schen Probe darboten. Der Vergleich wurde in annähernd gleich weiten Probiergläschen vorgenommen. Das Verfahren war recht umständlich. Es stellte sich als notwendig heraus, jedesmal eine ganze Skala der Vergleichsproben mit Kreatinin (es kamen Quantitäten von 0,0002 bis 0,01 g Kreatinin auf 10 ccm Wasser) herzustellen, da der Vergleich mit einer durch Verdünnung einer Ausgangslösung von bekanntem Gehalt erhaltenen Probe sich als unzulässig erwies.

Sowohl die Überführung von Kreatin in Kreatinin als auch die kolorimetrische Bestimmung sind, wie Folin auseinandergesetzt hat, mit einer gewissen Fehlerbreite behaftet. Doch fällt dieser Umstand für meine stets als Vergleichsversuche ausgeführten Bestimmungen, zumal bei der Größe der gefundenen Differenzen, nicht weiter ins Gewicht.

2.

Vorläufige Versuche gaben über das Verhalten des Kreatins in Fleischbrei und Preßsaft bei Dialyse gegen destilliertes Wasser Aufschluß.

Versuch 1. Die Muskeln der hinteren Extremitäten eines eben getöteten Kaninchens wurden fein zerkleinert und von dem Brei je 10 g mit 30 ccm destillierten Wassers zu einem Brei angerührt, der in Schilfschläuche gefüllt und gegen 150 ccm Wasser zur Dialyse gebracht wurde. Solcher Proben wurden drei angestellt, eine ohne, eine mit Toluol, eine nach vorhergehendem Aufkochen des Fleischbreies.

Ferner wurde aus einem Teile des Fleisches Preßsaft hergestellt und ebenfalls in drei Proben, eine ohne, eine mit Tulol, eine aufgekocht, zur Dialyse hingestellt. Das Außenwasser enthielt in allen Proben Kreatin; eine quantitative Verschiedenheit fiel nicht auf.

Frischer Fleischbrei gibt sonach gegen Wasser sein Kreatin leicht ab.

Versuch 2. Ganz frische Kaninchenmuskeln wurden, wie oben angegeben, zu zwei Fleischbündeln von 80 g und 60 g geformt und gegen 150 ccm destilliertes Wasser dialysieren gelassen. Das nach 5 Stunden entnommene Außenwasser enthielt Kreatin, ebenso das nach 15, 25 und 35 Stunden abgegossene. Eine Verschiedenheit wurde nicht bemerkt.

Mit Rücksicht auf den Umstand, daß Muskeln wie tierische Gewebe überhaupt in Ringerscher Lösung viel länger ihre vitalen Eigenschaften bewahren als selbst in physiologischer Kochsalzlösung, wurde von nun ab stets die Osmose gegen Ringersche Lösung vorgenommen.

Versuch 3. Proben von 20 g Fleischbrei aus ganz frischen Kaninchenmuskeln wurden in Schilfschläuchen gegen 170 ccm Ringerscher Lösung dialysieren gelassen, ebenso andererseits je 45 g des frischen Fleisches in Form von Fleischbündeln gegen 150 ccm der gleichen Lösung.

45 g Fleischbündel geben Kreatinin:

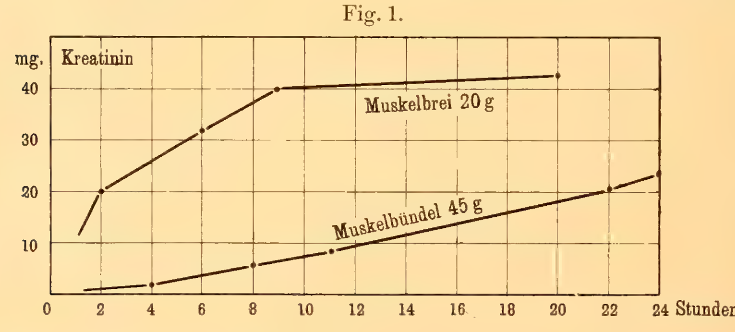
in den	ersten	4	Stunden	0,0020 g,	pro	Stunde	im	Mittel	0,0005 g
„	weiteren	4	„	0,0040 „	„	„	„	„	0,0010 „
„	„	3	„	0,0024 „	„	„	„	„	0,0008 „
„	„	11	„	0,0020 „	„	„	„	„	0,0011 „
„	„	2	„	0,0032 „	„	„	„	„	0,0016 „

20 g Fleischbrei geben Kreatinin:

in den	ersten	2	Stunden	0,0200 g,	pro	Stunde	im	Mittel	0,0100 g
„	weiteren	4	„	0,0120 „	„	„	„	„	0,0030 „
„	„	3	„	0,0080 „	„	„	„	„	0,0027 „
„	„	11	„	0,0024 „	„	„	„	„	0,0002 „

Wie aus dieser Tabelle hervorgeht, tritt das Kreatin aus den Fleischbündeln sehr viel langsamer heraus, als aus dem Fleischbrei. Trotz der mehr als doppelt so großen Muskelmenge ist in den ersten Stunden die herausdiffundierte Quantität zwanzigmal kleiner. Dies ist um so auffälliger, als man nicht erwarten kann, daß die Membran der Schilfwände, die trotz aller Zartheit vielmal stärker ist als das Sarkolemm, das Kreatin so viel leichter durchließe. Aber auch der Verlauf der Kreatinabgabe ist, wie sich

Fig. 1.



namentlich bei graphischer Verzeichnung ergibt, ein wesentlich verschiedener. Der Muskelbrei gibt zu Beginn rasch die Hauptmasse ab, während die Bündel das Kreatin nur langsam, nahezu der Zeit proportional, austreten lassen.

Diese Verschiedenheit könnte man zunächst versucht sein als eine Folge der ungleichen mechanischen Beschaffenheit von Muskel einerseits, Fleischbrei andererseits aufzufassen, zumal, wenn man sich erinnert, daß der Fleischbrei mit Ringerscher Lösung verdünnt war. Indes ist durch die experimentellen Untersuchungen von Voigtländer[1]) und Kurt Meyer[2]) klargestellt, welchen

[1]) Voigtländer, Zeitschr. f. physikal. Chemie 3, 310.
[2]) Kurt Meyer, Diese Beiträge 7, 293.

geringen Einfluß ein kolloidales Medium auf die osmotischen Vorgänge ausübt, so daß dieses Moment sicher nicht zur Erklärung ausreicht. Auch wäre aus diesem Moment höchstens eine Beschleunigung der Osmose für den Fleischbrei abzuleiten, der wesentlich andere Verlauf der Kurve bliebe unerklärt.

Der Versuch weist vielmehr auf eine andere Deutung hin: Der Austritt des Kreatins aus dem Fleischbrei erfolgt so, wie man ihn erwarten kann, wenn der Brei einen Vorrat davon enthält, während die Muskelbündel sich so verhalten, als wenn überhaupt kein solcher Vorrat von vornherein vorhanden wäre, vielmehr als wenn erst nach Beginn der Dialyse die Bildung von Kreatin bzw. Abspaltung desselben aus einer nicht dialysablen Vorstufe einträte und in annähernd gleichem Tempo weiterginge.

Diese Vorstellung läßt eine weitere Prüfung zu. Ist die Bildung des Kreatins ein im intakten Muskel sich allmählich abspielender Vorgang, so ist zu erwarten, daß sich darin bei Aufbewahrung ein Vorrat von Kreatin anhäuft. Ein solcher Muskel muß dann bei Dialyse im Anfang viel mehr Kreatin durch Osmose abgeben können, als der ganz frische. Daß der zerkleinerte Muskel sein Kreatin so rasch abgibt, wäre dann so zu deuten, daß die mechanische Zertrümmerung des Gewebes bereits in kurzer Zeit jene Veränderung der anzunehmenden Vorstufe des Kreatins bewirkt, die sich beim intakten Muskel nur langsam einstellt. Da es ohne Schwierigkeit gelingt, dem Muskel sein Kreatin durch siedendes Wasser zu entziehen, so wäre die gleiche Annahme auch für die Einwirkung hoher Temperaturen zu machen.

Der Versuch scheint diese Anschauungsweise zu bestätigen.

Versuch 4. Hundemuskeln wurden einerseits ganz frisch, andererseits nach 24stündigem Lagern auf Eis, und zwar als Fleischbündel und als Fleischbrei, in beschriebener Weise auf Kreatinabgabe bei der Dialyse untersucht. Es kamen 50 g Fleischbündel gegen 170 ccm Ringersche Lösung und 25 g Fleischbrei gegen 150 ccm Ringersche Lösung zur Dialyse.

50 g Fleischbündel geben Kreatinin:

frisch:

in 2 Stunden	0,0032 g,	somit pro Stunde	0,0016 g
„ weiteren 2 Stunden	0,0040 „	„ „ „	0,0020 „
„ „ 2 „	0,0040 „	„ „ „	0,0020 „
„ „ 3 „	0,0040 „	„ „ „	0,0013 „
„ „ 7 „	0,0080 „	„ „ „	0,0012 „
„ „ 8 „	0,0120 „	„ „ „	0,0015 „
„ „ 19 „	0,0200 „	„ „ „	0,0011 „

nach 24 Stunden:

in 2 Stunden	0,0200 g,	somit pro	Stunde	0,0100 g
„ weiteren 2 Stunden	0,0080 „	„ „	„	0,0040 „
„ „ 2 „	0,0080 „	„ „	„	0,0040 „
„ „ 3 „	0,0080 „	„ „	„	0,0027 „
„ „ 7 „	0,0120 „	„ „	„	0,0017 „
„ „ 8 „	0,0120 „	„ „	„	0,0015 „
„ „ 19 „	0,0120 „	„ „	„	0,0006 „

25 g Fleischbrei geben Kreatinin,
wenn aus frischen Muskeln hergestellt:

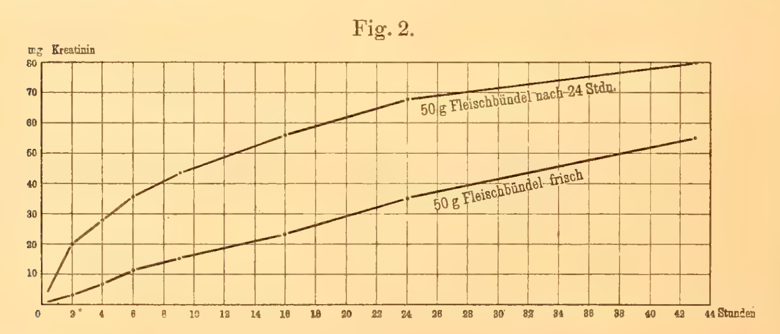
in 2 Stunden	0,0160 g,	somit pro	Stunde	0,0080 g
„ weiteren 2 Stunden	0,0120 „	„ „	„	0,0060 „
„ „ 2 „	0,0040 „	„ „	„	0,0020 „
„ „ 3 „	0,0020 „	„ „	„	0,0007 „

aus Muskel nach 24 Stunden hergestellt:

in 2 Stunden	0,0120 g,	somit pro	Stunde	0,0060 g
„ weiteren 2 Stunden	0,0080 „	„ „	„	0,0040 „
„ „ 2 „	0,0032 „	„ „	„	0,0016 „
„ „ 3 „	0,0032 „	„ „	„	0,0011 „

Wie aus diesen Zahlen zu entnehmen ist, verhält sich in der Tat der einige Zeit auf Eis aufbewahrte Muskel so, als ob er von vornherein einen höheren Kreatingehalt hätte; während des Lagerns muß also durch Bildung von Kreatin eine Anspeicherung daran erfolgt sein. Denn die andere etwa zu machende Annahme, daß

Fig. 2.



das Sarkolemm während des Lagerns an Durchlässigkeit für Kreatin gewonnen hätte, hat kaum etwas für sich, zumal nicht bekannt ist, daß das Sarkolemm postmortalen Veränderungen unterliegt, während chemische Veränderungen der kontraktilen Substanz, Säurebildung, Gerinnung der Eiweißstoffe usf., gerade zu dieser Zeit wahrnehmbar werden.

Die Fleischbreiversuche gaben, ob der Muskel frisch oder nach 24stündigem Lagern zu Brei verwandelt wird, annähernd das gleiche Resultat.

Das Ergebnis des Versuches 4 wurde bei Wiederholung mit noch länger lagernden Muskeln bestätigt gefunden.

Versuch 5. Hundemuskeln. Fleischbündel und Fleischbrei einerseits von ganz frischen, andererseits von 48 Stunden auf Eis lagernden Muskeln.

50 g Fleischbündel frisch geben Kreatinin:

in 2 Stunden	0,0060 g,	somit pro Stunde	0,0030 g
„ weiteren 2 Stunden	0,0060 „	„ „ „	0,0030 „
„ „ 2 „	0,0060 „	„ „ „	0,0030 „
„ „ 3 „	0,0060 „	„ „ „	0,0020 „
„ „ 7 „	0,0080 „	„ „ „	0,0011 „
„ „ 8 „	0,0080 „	„ „ „	0,0010 „
„ „ 19 „	0,0016 „	„ „ „	0,0008 „

50 g Fleischbündel nach 48 Stunden geben Kreatinin:

in 2 Stunden	0,0080 g,	somit pro Stunde	0,0040 g
„ weiteren 2 Stunden	0,0240 „	„ „ „	0,0120 „
„ „ 2 „	0,0160 „	„ „ „	0,0080 „
„ „ 3 „	0,0080 „	„ „ „	0,0027 „
„ „ 7 „	0,0160 „	„ „ „	0,0023 „
„ „ 8 „	0,0200 „	„ „ „	0,0025 „
„ „ 19 „	0,0240 „	„ „ „	0,0013 „

25 g Fleischbrei aus frischen Muskeln geben Kreatinin:

in 2 Stunden	0,0032 g,	somit pro Stunde	0,0016 g
„ weiteren 2 Stunden	0,0180 „	„ „ „	0,0090 „
„ „ 2 „	0,0080 „	„ „ „	0,0040 „
„ „ 3 „	0,0028 „	„ „ „	0,0009 „
„ „ 7 „	0,0024 „	„ „ „	0,0003 „

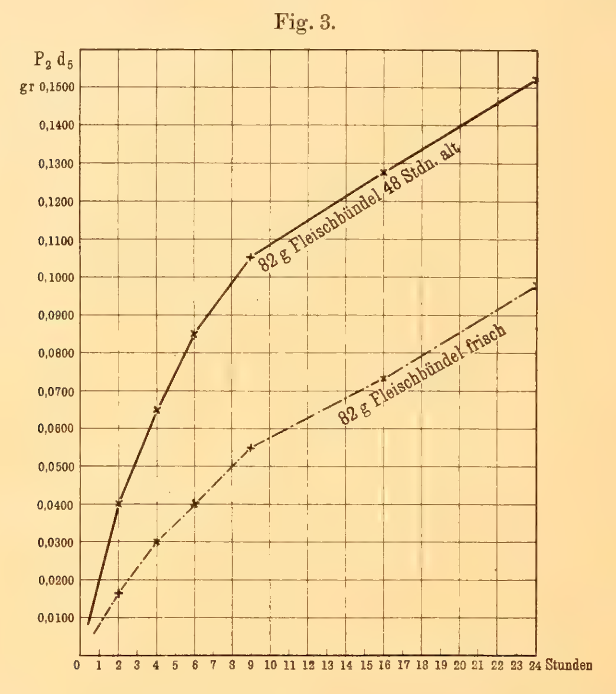
25 g Fleischbrei aus 48 Stunden bei Eis aufbewahrten Muskeln geben Kreatinin:

in 2 Stunden	0,0080 g,	somit pro Stunde	0,0040 g
„ weiteren 2 Stunden	0,0200 „	„ „ „	0,0100 „
„ „ 2 „	0,0100 „	„ „ „	0,0050 „
„ „ 3 „	0,0060 „	„ „ „	0,0020 „
„ „ 7 „	0,0028 „	„ „ „	0,0004 g

Es wäre natürlich von hohem Interesse festzustellen, welcher Natur jener Bestandteil des Muskelprotoplasmas ist, der das Kreatin abgibt. Die Gleichzeitigkeit der Kreatinabspaltung mit anderen postmortalen im Muskel sich abspielenden Vorgängen, z. B. der Säurebildung, weist darauf hin, daß es sich hier um eine einzelne Erscheinung aus einem ganzen Komplex ähnlicher Prozesse handelt.

So ist bekannt, daß sich im Muskel postmortal eine Erhöhung des Gehalts an anorganischer Phosphorsäure einstellt[1]). Allerdings ist bei der üblichen Methode in den ersten Stunden nach dem Tode eine solche Erhöhung nicht beobachtet worden. Dabei ist aber zu bedenken, daß in diesen Versuchen die Phosphorsäure dem Muskel behufs Bestimmung durch anhaltendes Kochen entzogen wurde. Falls es sich nun um eine thermolabile Phosphorsäureverbindung handelt, so konnte man auf diesem Wege überhaupt keinen Aus-

Fig. 3.



schlag erhalten. Von der Möglichkeit ausgehend, daß die vermutete Kreatinverbindung im lebenden Muskel ein sehr labiles Nukleïnsäurederivat sein könnte, empfahl mir Herr Prof. Hofmeister, analoge Dialysierversuche über etwaige gleichzeitige Abspaltung von dialysabler Phosphorsäure auszuführen.

Versuch 6. Der Versuch wurde an Hundemuskeln, ganz ähnlich wie Versuch 5, ausgeführt; nur wurde im Dialysat nicht das Kreatin, sondern die Phosphorsäure, und zwar nach Neumann, bestimmt. Es dialysierten je 82 g Fleischbündel gegen 170 ccm und 25 g Fleischbrei gegen 150 ccm Ringerscher Lösung.

---

[1]) Vgl. v. Fürth, Ergebnisse der Physiologie von Asher und Spiro, 2 Jahrg., I. Abt., S. 600.

82 g Fleischbündel aus frischen Muskeln geben ab P_2O_5:

in 2 Stunden	0,0163 g,	somit pro Stunde	0,0082 g
„ weiteren 2 Stunden	0,0131 „	„ „ „	0,0066 „
„ „ 2 „	0,0112 „	„ „ „	0,0056 „
„ „ 3 „	0,0142 „	„ „ „	0,0047 „
„ „ 7 „	0,0179 „	„ „ „	0,0025 „
„ „ 8 „	0,0251 „	„ „ „	0,0032 „

82 g Fleischbündel aus 48 Stunden alten Muskeln geben ab P_2O_5:

in 2 Stunden	0,0399 g,	somit pro Stunde	0,0200 g
„ weiteren 2 Stunden	0,0255 „	„ „ „	0,0128 „
„ „ 2 „	0,0204 „	„ „ „	0,0102 „
„ „ 3 „	0,0190 „	„ „ „	0,0063 „
„ „ 7 „	0,0228 „	„ „ „	0,0033 „
„ „ 8 „	0,0245 „	„ „ „	0,0031 „

25 g Fleischbrei aus frischen Muskeln geben ab an P_2O_5:

in 2 Stunden	0,0312 g,	somit pro Stunde	0,0156 g
„ weiteren 2 Stunden	0,0137 „	„ „ „	0,0069 „
„ „ 2 „	0,0082 „	„ „ „	0,0041 „
„ „ 3 „	0,0062 „	„ „ „	0,0021 „
„ „ 7 „	0,0032 „	„ „ „	0,0005 „
„ „ 8 „	0,0051 „	„ „ „	0,0006 „

25 g Fleischbrei aus 48 Stunden alten Muskeln geben ab an P_2O_5:

in 2 Stunden	0,0392 g,	somit pro Stunde	0,0196 g
„ weiteren 2 Stunden	0,0142 „	„ „ „	0,0071 „
„ „ 2 „	0,0098 „	„ „ „	0,0049 „
„ „ 3 „	0,0075 „	„ „ „	0,0028 „
„ „ 7 „	0,0041 „	„ „ „	0,0006 „
„ „ 8 „	0,0018 „	„ „ „	0,0002 „

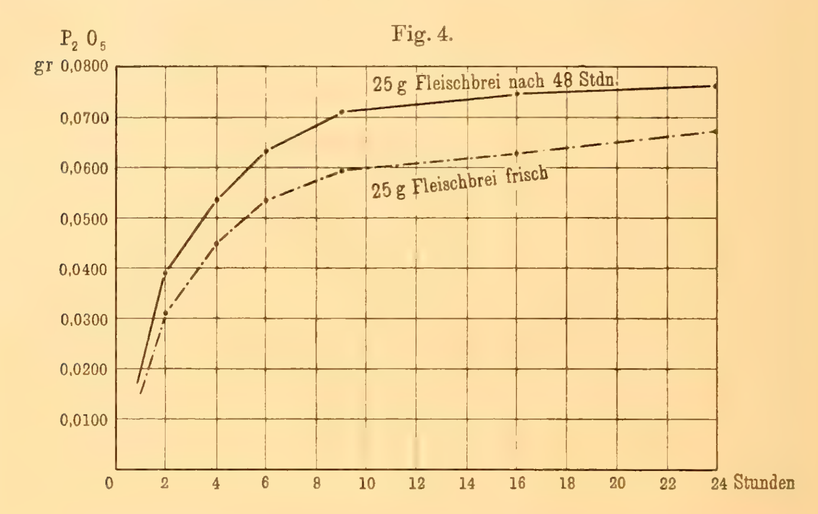
Wenn es gestattet ist, aus dieser einen Versuchsreihe einen Schluß zu ziehen, so liegen die Verhältnisse für die Abspaltung von dialysablen Phosphorsäureverbindungen aus im Muskel präformierten nicht dialysablen ähnlich wie beim Kreatin. Auch hier enthält der auf Eis lagernde Muskel nach 48 Stunden einen viel größeren Vorrat an der dialysablen Verbindung (vermutlich Orthophosphat) als der frische, und auch hier scheint die mechanische Zertrümmerung die Bildung dieser Verbindung außerordentlich zu begünstigen. Die oben angedeutete Vermutung, daß Kreatin und Phosphorsäure aus demselben im lebenden Muskel vorgebildeten Komplex stammen, ist sonach nicht schlechterdings zurückzuweisen.

3.

Die mitgeteilten Tatsachen sprechen dafür, daß der frische Muskel sich in bezug auf die Abgabe des Kreatins bei der Dialyse

vom abgestorbenen verschieden verhält. Er enthält anscheinend das Kreatin mindestens zu einem großen Teile in einer nicht dialysablen Form. Kochen oder Zertrümmern des Muskels führte rasch zur Bildung von freiem Kreatin; beim Lagern auf Eis erfolgt diese Veränderung allmählich. Man darf wohl den Vorgang als einen Teil jener „post mortem" auftretenden chemischen Umwandlungen ansehen, als deren auffälligste Folge die „Totenstarre" seit jeher die Aufmerksamkeit auf sich gelenkt hat. Ob eine Beziehung zur Muskelkontraktion besteht, bleibt noch zu untersuchen.

Fig. 4.



Die Tatsache, daß anscheinend so wenig chemisch wirksame Eingriffe, wie es die mechanische Zerkleinerung ist, bereits sehr erhebliche chemische Veränderungen verursachen können, zeigt, daß uns die üblichen Untersuchungsmethoden eine nur unvollkommene Kenntnis von dem chemischen Bau des intakten Organs geben können. Sie macht es auch verständlich, daß es nur in einem Teile der Fälle gelingt, die in den Organen sich abspielenden Reaktionen mit Organbrei nachzuahmen.

In bezug auf die Rolle des Kreatins im Muskel führt das Mitgeteilte zu der Vorstellung, die sich schon, wie eingangs auseinandergesetzt, aus dessen Retention im lebenden Organismus ergibt, nämlich, daß das Kreatin ein wesentlicher Bestandteil des Muskelprotoplasmas ist. Damit ist eine nach Abschluß vorstehender Arbeit von Folin[1]) mitgeteilte interessante Beobachtung gut in

[1]) O Folin, The Chemistry and Biochemistry of Kreatin and Kreatinin. Festschrift Olof Hammarsten gewidmet, Upsala und Wiesbaden 1906.

Einklang zu bringen. Kreatin (aber nicht Kreatinin) neben stickstoffarmer Kost gereicht, wird vom Organismus zum Teile zurückbehalten. Die Fähigkeit der Muskeln, Kreatin zu binden, dürfte sich danach unter Umständen auch auf das vom Blute den Muskeln zugeführte erstrecken, womit wieder der allerjüngst von Jaffé[1]) ermittelte Befund übereinstimmt, daß Darreichung des in Kreatin übergehenden Glycocyamins den Kreatingehalt der Muskeln erhöht.

[1]) Jaffé, Zeitschrift f. physiol. Chemie 48, 456.

IX.

Über den Einfluß der Aminosäuren auf die Acetonkörperausscheidung.

Von **L. Borchardt** und **F. Lange.**

Aus der inneren Abteilung des städtischen Krankenhauses in Wiesbaden.
(Oberarzt: Prof. Dr. Weintraud.)

Die Frage nach der Herkunft der Acetonkörper, die mit der vermeintlichen Erkenntnis der Entstehung des Acetons aus Fett bereits gelöst zu sein schien, kam neuerdings wieder in Fluß, als man begann die Nahrungstoffe nicht als Einheiten, sondern als komplizierte Körper anzusehen, deren Bausteine jeder für sich Einflüsse auf die Stoffwechselvorgänge auszuüben vermag. Mit der Feststellung der Tatsache, daß die Kohlehydrate die Acetonausscheidung vermindern, mit der Behauptung, daß die Fette die alleinigen Muttersubstanzen der Acetonkörper sind (oder doch solche allein enthalten), schließt die ältere Periode der Acetonuntersuchungen ab.

Die neueren Untersuchungen konnten also hinsichtlich der Genese der Acetonkörper nur mit einer Tatsache rechnen: dem vermindernden Einfluß der Kohlehydratnahrung auf die Acetonkörperausscheidung. Gemäß der Tendenz unserer Zeit, die Nahrungsstoffe zu zergliedern und in ihren einfachsten Komponenten die Momente zu suchen, die für Stoffwechsel und Ernährung bestimmend sind, entstand die Frage: Welche Komponenten der Fette sowohl wie der Eiweißkörper wirken vermindernd, welche fördernd auf die Acetonkörperausscheidung? Sind unter diesen Vermehrern der Acetonkörperausscheidung solche Substanzen, aus denen Oxybuttersäure oder Aceton direkt entstehen können? Und welche Substanzen sind schließlich als Quellen der Acetonkörper anzusehen?

Die Zusammensetzung der Fette ist länger und genauer bekannt als die der Eiweißkörper. So wurde zuerst die Frage

aufgeworfen: Wie wirken die Bestandteile der Fette, Glycerin und Fettsäuren, auf die Acetonkörperausscheidung? Hirschfeld[1]) zeigte, daß Glycerin die Acetonkörperausscheidung herabsetzt. Nachdem dann Geelmuyden[2]) die Vermutung ausgesprochen hatte, daß die Fettsäuren die Muttersubstanzen der Acetonkörper seien, galt diese Annahme nach den Untersuchungen von Waldvogel, Schwarz, Mohr und Loeb u. a. für erwiesen; es hatte sich nämlich gezeigt, daß Buttersäure, Valeriansäure und Capronsäure die Acetonkörperausscheidung vermehren. Diese Resultate wurden dann dahin verallgemeinert, daß alle Fettsäuren oder auch nur alle niederen die Acetonkörperausscheidung vermehren, obwohl einige Versuche von Schwarz gegen eine Verallgemeinerung der Resultate in diesem Sinne sprachen, und daß die als Vermehrer der Acetonkörperausscheidung erkannten Fettsäuren Muttersubstanzen der ausgeschiedenen Acetonkörper sein mußten.

Schwarz hatte nur für die Butter-, Valerian- und Capronsäure ketoplastische Eigenschaften feststellen können; die Propionsäure zeigte keinen Einfluß auf die Acetonkörperausscheidung. Baer und Blum[3]) vermuten, daß Schwarz statt der n-Valeriansäure Isovaleriansäure benutzte, da diese, nicht aber die n-Valeriansäure, die Acetonkörperausscheidung vermehrt. Mit essigsaurem Natron erzielte Satta gleichfalls eine Vermehrung der Acetonausscheidung, während Baer und Blum nach n-Valeriansäure die Acetonkörperausscheidung sogar sinken sahen. Aber auch für Fettsäuren, die die Acetonausscheidung vermehren, läßt sich eine andere Erklärung dieser Wirkung finden. Es spricht manches dafür (Borchardt[4]), daß die ketoplastische Wirkung dieser Fettsäuren zum Teil dadurch bedingt sein könnte, daß sie sich im Tierkörper mit Glycerin, dessen Abbau vermindernd auf die Acetonkörperausscheidung wirkt, zu Neutralfetten verbinden und dieses damit dem Organismus entziehen. Jedenfalls ist dieser Vorgang für die Wirkungsweise der Fettsäuren mit in Betracht zu ziehen, da Fettsäuren offenbar nur in ganz geringer Menge in anderer Form, nämlich als Seifen, resorbiert werden.

Nachdem so die Frage nach den Beziehungen der Fettkomponenten zur Acetonkörperausscheidung zwar nicht gelöst, aber doch

---

[1]) Zeitschr. f. klin. Med. 28, 176 (1895).
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chemie 23, 431 (1897).
[3]) Archiv f. exp. Path. und Pharm. 55, 89 (1906).
[4]) Zentralbl. f. d. ges. Physiol. und Path. d. Stoffw. N. F. 1, 129 (1906).

recht wesentlich gefördert worden war, entstand die weitere Frage: Enthalten auch die Eiweißkörper vermehrende und vermindernde Komponenten für die Acetonkörperausscheidung? Diese Frage wurde in einer früheren Arbeit[1]) des einen von uns zuerst aufgeworfen und bejahend beantwortet, ohne daß über die Natur dieser Substanzen mehr als Vermutungen aufgestellt werden konnten. Es wurde damals die mittlerweile als falsch erwiesene Annahme gemacht, daß die Monaminosäuren des Eiweißmoleküls hemmend auf die Acetonkörperausscheidung einwirken, weil Eiweißkörper, die sehr arm an Monaminosäuren sind, die Acetonkörperausscheidung vermehren, solche, die reichlich Monoaminosäuren enthalten, sie vermindern. Wir werden später sehen, welche Momente den damals gefundenen Einfluß auf die Acetonkörperausscheidung bedingten.

So war die ursprüngliche rein biologische Betrachtungsweise der Acetonkörperfrage mehr zu einer biochemischen geworden. Sie sollte eine rein chemische werden.

Schon die ersten Autoren, welche den Einfluß der Fettsäuren auf die Acetonkörperausscheidung studierten, hatten versucht, den Übergang von Fettsäuren in Oxybuttersäure nach chemischen Gesetzen zu erklären. Das ist natürlich. In neuester Zeit nun ist es gelungen, einen einheitlichen chemischen Standpunkt einzunehmen; statt der deduktiven bevorzugt man jetzt die induktive Schlußfolgerung. Die Fragestellung lautet nun: Welche chemischen Substanzen (es handelt sich vorzüglich um Fettsäuren und deren Derivate) können in Oxybuttersäure (oder auch direkt in Aceton) übergehen? Und soweit diese Frage beantwortet ist: Welche von diesen Substanzen kommen in der Nahrung vor (in Fetten oder Eiweißstoffen), können also als Quellen der Acetonkörper in Betracht kommen?

Bei der Art und Weise, wie wir uns die Frage ursprünglich gestellt hatten, suchten wir nur den Einfluß der als Spaltungsprodukte des Eiweißmoleküls bekannten Monaminosäuren auf die Acetonkörperausscheidung festzustellen. Sie sollen der Reihe nach besprochen werden, unabhängig davon, ob sie vermehrend oder vermindernd auf die Acetonkörperausscheidung wirken. Es wird sich am Schlusse dieser Arbeit zeigen, ob und in welcher Weise unsere Resultate die von anderen gefundenen

[1]) Borchardt, Über den Einfluß des Eiweißstoffwechsels auf die Acetonkörperausscheidung. — Arch. f. exp. Path. und Pharm. 53, 388 (1905).

Gesetze der Acetonkörperausscheidung bestätigen und welche Aussichten sie für die Untersuchung des Einflusses weiterer Abbauprodukte des Eiweißmoleküls auf die Acetonkörperausscheidung bieten.

Über den Einfluß sicher charakterisierter chemischer Verbindungen auf die Acetonkörperausscheidung ist bisher folgendes bekannt: Als Hauptrepräsentanten der Gruppe, die die Acetonkörperausscheidung herabsetzt, wurden die Kohlehydrate bereits genannt. Als Anteil aus dem Fettmolekül schließt sich diesen das Glycerin an. Satta[1]) fand weiter, daß der Weinsäure, Milchsäure und Citronensäure ein vermindernder Einfluß auf die Acetonkörperausscheidung, eine antiketoplastische Wirkung, zukommt. Diesen gemeinsam ist die Hydroxylgruppe. Da jedoch auch Oxybuttersäure diese Gruppe enthält, war Satta nicht berechtigt, sie als den Träger der antiketoplastischen Eigenschaft anzusehen. Satta dachte schon daran, daß sich die Aminosäuren ebenso verhalten würden wie die entsprechenden Oxysäuren, die er geprüft hatte. Diese Voraussetzung ist bisher durchaus bestätigt worden, nur daß in den Fällen, wo Oxysäuren eine Vermehrung der Acetonkörperausscheidung verursachten, auch die entsprechenden Aminosäuren die Acetonkörperausscheidung vermehrten. Darauf wird gelegentlich der Besprechung der ketoplastischen Substanzen zurückzukommen sein. Antiketoplastische Eigenschaften scheinen nach Baer und Blum[2]) auch der n-Valeriansäure und der Isobuttersäure zuzukommen, während Oxy- und Aminoisobuttersäure jedenfalls nicht ketoplastisch wirken.

Die Gesetze der Acetonkörperbildung ergaben sich zum großen Teile aus den schönen Untersuchungen von Embden, Salomon und Schmidt[3]); die Autoren durchbluteten die Leber von Hunden unter Zusatz gewisser Substanzen, deren Einfluß auf den Acetongehalt des abfließenden Blutes erwies, ob es sich um Acetonbildung handelt oder nicht.

Die Übertragung dieser Resultate auf den Stoffwechselversuch war mit Schwierigkeiten verbunden; wegen der bekannten Differenzen in der Acetonkörperausscheidung zwischen Mensch und Tier — Differenzen, die nach Untersuchungen von Baer übrigens nur graduelle sind — konnten nur an Menschen Versuche angestellt werden. Die Menge der zu verfütternden Substanzen mußte ziem-

[1]) Diese Beiträge 6, 376 (1905).
[2]) l. c.
[3]) Diese Beiträge 8, 129 (1906).

lich groß sein und es ist schwierig und kostspielig, die Substanzen in größerer Menge zu beschaffen. So mußten wir uns mit einer relativ geringen Zahl von Versuchen begnügen.

Unsere Versuche wenden sich, nachdem Embden die wichtigsten Grundtatsachen festgestellt hat, aus welchen Substanzen theoretisch im Organismus Aceton entstehen kann, aus welchen nicht, der Frage nach den Beziehungen zwischen den als Eiweißspaltungsprodukte bekannten Aminosäuren und der Acetonkörperausscheidung zu. Es galt zu prüfen, ob die Aminosäuren des Eiweißmoleküls denselben Einfluß im Stoffwechselversuch auf die Acetonkörperausscheidung ausüben wie bei der Durchblutung der Leber.

Wir untersuchten Glykokoll, Alanin, Asparagin, Glutaminsäure und Leucin.

Die Art der Versuchsanordnung war folgende: Im Selbstversuch wurde durch eine gleichmäßige kohlehydratfreie Kost eine konstante Acetonurie erzeugt. Durch Zulage der betreffenden Aminosäuren wurde der Einfluß auf die Acetonkörperausscheidung geprüft. Die Aminosäuren wurden an den Versuchstagen in den angegebenen Mengen gegen 11^{h} früh auf einmal genommen. Die Versuchsdauer erstreckte sich im allgemeinen auf 3 bis 4 Vortage, 2 Versuchstage und 2 Nachtage. Die Kost wurde zumeist von uns selbst abgewogen. Durch das Einschalten zweier Versuchstage konnten Einflüsse leichter Dyspepsien und ähnlicher Störungen ziemlich sicher erkannt werden. Die Nachtage zeigen das Abklingen der beobachteten Wirkung und waren demnach geeignet, die gefundenen Resultate zu kontrollieren. Sämtliche Versuche wurden an dem einen von uns (B.) angestellt. Die Versuchsperson ist 27 Jahre alt, 68 kg schwer, von gut entwickelter Muskulatur, mäßigem Fettpolster und im übrigen ganz gesund.

Die angewendeten Methoden unterscheiden sich nur in wenigen Punkten von denen der früheren Versuche[1]). Der Stickstoff wurde nach Kjeldahl, das Ammoniak nach Schlösing nach 3- bis 4tägigem Stehen bestimmt. Für die Bestimmung des Acetons im Urin bedienten wir uns wieder der Methode von Messinger-Huppert. Der Urin wurde unter Toluol aufgefangen und sofort verarbeitet. Sämtliche Analysen wurden doppelt ausgeführt. Durch Bestimmung der Polarisationswerte überzeugten wir uns in jedem Falle, daß Oxybuttersäure in nachweisbarer Menge nicht zur Ausscheidung kam. Auf Acetessigsäure

---

[1]) Archiv für exp. Path. und Pharm. 53, 388 (1905).

wurde nach Gerhardt in der üblichen Weise mit Eisenchlorid untersucht.

Die Bestimmung des Acetons in der Atemluft geschah nach dem Verfahren von Waldvogel[1]) mit dem von diesem angegebenen Atmungsapparat. Es wurde dreimal 10 Minuten täglich am Apparat geatmet und zwar immer zur gleichen Stunde. Es erscheint uns für vergleichende Stoffwechselversuche von außerordentlicher Wichtigkeit, das Atmen am Atmungsapparat stets zur gleichen Stunde vorzunehmen. Wir atmeten in allen unseren Versuchen je 10 Minuten um 2 Uhr vor dem Essen, um 3 Uhr nach dem Essen und um 10 Uhr etwa 1 Stunde nach dem Abendessen. Auf diese Weise mußte eine Vermehrung oder Verminderung des Acetongehalts der Atemluft in allen Fällen zum Ausdruck kommen. Hält man bestimmte Tageszeiten für das Atmen am Apparat nicht inne, so ist man Fehlern ausgesetzt, die bisher noch unberechenbar sind[2]).

Wie in früheren Versuchen wurde in den Selbstversuchen die Spritzflasche mit Gummigebläse armiert, so daß ein Fehler durch Übergang des Acetons der Atemluft in das Wasser der Spritzflasche auf diese Weise vermieden werden konnte.

In zwei Versuchen wurde der Einfluß des Glykokolls[3]) $CH_2(NH_2).COOH$ auf die Acetonkörperausscheidung geprüft. Das Glykokoll ist die Aminoessigsäure. Von der Essigsäure hatte Satta[4]) nachgewiesen, daß ihr Natronsalz eine geringe Vermehrung der Acetonausfuhr bewirkt. Satta macht selbst darauf aufmerksam, daß diese Versuche nicht einwandfrei sind, da Natronzufuhr allein auch schon eine geringe Vermehrung der Acetonausscheidung hervorrufen kann. Das Glykokoll verhält sich jedenfalls anders. Embden, Salomon und Schmidt hatten gefunden, daß Glykokoll den Acetongehalt des Leberblutes bei künstlicher Durchblutung nicht steigert. Unsere Versuche zeigen, daß es auch im Stoffwechselversuch nicht zu den ketoplastischen Substanzen gehört.

Im ersten Versuch trat eine Steigerung der Acetonausfuhr am zweiten Glykokolltage auf; an diesem Tage waren starke dys-

[1]) Waldvogel, Die Acetonkörper. Stuttgart, F. Enke, 1903.

[2]) Schwarz (18. Kongreß für innere Medizin 1900) berichtet über mehrere Fälle, bei denen die Acetonausscheidung durch die Atemluft zu verschiedenen Tageszeiten beträchtlichen Schwankungen unterworfen war, ohne daß die dafür maßgebenden Einflüsse erkannt werden konnten.

[3]) Das Präparat wurde von Kahlbaum, Berlin, bezogen.

[4]) Diese Beiträge 6, 25 (1905).

Tabelle I.

Datum	Harnmenge ccm	Spez. Gewicht	N g	NH_3 g	Aceton im Urin g	Aceton in der Atemluft g	$FeCl_3$-Reaktion	Acetonkörpersumme als Oxybuttersäure g	Polarisation Proz. Z. [1]	Bemerkungen
15. X.	1300	1021	17,02	0,789	0,124	0,042	0	0,291	— 0,05	
16. X.	1000	1028	18,20	1,102	0,238	0,093	0	0,579	0	
17. X.	980	1030	18,42	1,224	0,410	0,088 [2]	0	> 0,872	— 0,05	
18. X.	1150	1025	17,25	1,333	0,441	0,181	0	1,089	0	
19. X.	1400	1023	20,18	1,442	0,527	0,135	0	1,159	— 0,1	Zulage: 40 g Glykokoll
20. X.	1100	1028	20,83	1,537	0,692	0,260	0	1,666	— 0,05	„ 40 „ „ [3]
21. X.	1080	1023	16,07	1,442	0,493	0,102	0	1,041	— 0,1	
22. X.	1350	1019	15,29	1,210	0,522	0,088	0	1,068	— 0,1	

Tabelle II.

Datum	Harnmenge ccm	Spez. Gewicht	N g	NH_3 g	Aceton im Urin g	Aceton in der Atemluft g	$FeCl_3$-Reaktion	Acetonkörpersumme als Oxybuttersäure g	Polarisation Proz. Z.	Bemerkungen
9. V.	1020	1026	14,67	0,694	0,068	0,051	0	0,208	0	
10. V.	1280	1021	18,37	0,934	0,313	0,214	0	0,922	0	
11. V.	950	1026	18,31	1,360	0,588	0,288	Spur	1,533	— 0,1	
12. V.	1030	1026	20,33	1,523	0,572	0,209	„	1,367	— 0,1	Zulage: 30 g Glykokoll
13. V.	1150	1024	21,0	1,319	0,491	0,188	„	1,363	— 0,1	„ 30 „ „
14. V.	810	1026	15,85	1,347	0,588	0,361	+	1,661	— 0,1	
15. V.	940	1027	16,24	1,047	0,600	0,306	Spur	1,586	— 0,1	

[1]) Die Polarisationswerte sind in Zuckerprozenten angegeben. — [2]) Verlust. — [3]) Starke dyspeptische Beschwerden. Keine Durchfälle. Etwas erhöhte Temperatur.

Tabelle III.

Datum	Harnmenge ccm	Spez. Gewicht	N g	NH_3 g	Aceton im Urin g	Aceton in der Atemluft g	$FeCl_3$-Reaktion	Acetonkörpersumme als Oxybuttersäure g	Polarisation Proz. Z.	Bemerkungen
17. VII.	1050	1023	16,41	0,925	0,128	0,176(?)	0	0,532	0	
18. VII.	1450	1021	19,43	1,075	0,286	0,070	0	0,623	0	
19. VII.	1500	1020	18,65	1,075	0,551	0,094	+	1,129	0	
20. VII.	1500	1024	20,55	1,414	0,561	0,116	+	1,185	— 0,1	Zulage: 25 g Alanin
21. VII.	1100	1026	19,15	1,387	0,460	0,046	+	0,886	0	„ 25 „ „
22. VII.	1150	1025	19,21	1,550	0,659	0,130	+	1,381	0	
23. VII.	1080	1026	18,26	1,632	0,706	0,148	+	1,495	— 0,1	
24. VII.	1050	1025	17,14	1,686	0,764	0,148	+	1,596	0	

Tabelle IV.

Datum	Harnmenge ccm	Spez. Gewicht	N g	NH_3 g	Aceton im Urin g	Aceton in der Atemluft g	$FeCl_3$-Reaktion	Acetonkörpersumme als Oxybuttersäure g	Polarisation Proz. Z.	Bemerkungen
19. IX.	1250	1027	18,87	0,979	0,043	0,028	0	0,124	0	
20. IX.	900	1027	16,35	0,925	0,128	0,074	Spur	0,354	— 0,1	
21. IX.	950	1027	17,75	1,088	0,466	0,251	„	1,255	— 0,1	
22. IX.	1500	1020	22,29	1,541	0,338	0,102	+	0,770	— 0,1	Zulage: 50 g Alanin
23. IX.	1250	1025	21,28	1,469	0,451	0,164	+	1,076	— 0,1	„ 50 „ „
24. IX.	870	1029	15,90	1,248	0,659	0,163 [1]	+	>1,494	— 0,1	
25. IX.	950	1027	15,79	1,374	0,750	0,422	+	2,056	— 0,1	

[1]) Verlust.

peptische Beschwerden vorhanden. Wie auch aus dem zweiten Versuch hervorgeht, waren diese offenbar die Ursache für die Acetonvermehrung. Jedenfalls hat das Glykokoll keinen vermehrenden Einfluß auf die Acetonkörperausscheidung. Nach dem zweiten Versuch, der ohne Störung verlief, scheint es vielmehr, daß das Glykokoll die Acetonkörperausscheidung herabsetzt.

Die nächst höhere Aminosäure, das Alanin, stammt von der Propionsäure ab und ist α-Aminopropionsäure. Die Propionsäure war in einem Versuche von Schwarz[1]) ohne Einfluß auf die Acetonkörperausscheidung geblieben. Alanin zeigte bei Leberdurchblutung (Embden, Salomon und Schmidt) keine Acetonvermehrung des Durchströmungsblutes. Wir verfügen über zwei Stoffwechselversuche mit Alanin[2]). (S. Tab. III und IV, S. 123.)

Aus beiden Versuchen geht unzweideutig hervor, daß das Alanin, wie die entsprechende Oxysäure, die Milchsäure, die Acetonkörperausscheidung herabsetzt.

Dieses Resultat ist nicht wunderbar. Wie Neuberg und Langstein zeigten, scheiden Kaninchen, die man mit Alanin füttert, größere Mengen Milchsäure aus. Auch bei der Durchblutung der Leber mit Alanin entstand Milchsäure[3]). Aus dem Alanin entsteht also durch Desamidierung die Oxysäure.

$$\begin{array}{c} CH_3 \\ | \\ C{<}^{H}_{NH_2} \\ | \\ COOH \\ \text{Alanin} \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} CH_3 \\ | \\ C{<}^{H}_{OH} \\ | \\ COOH \\ \text{Milchsäure} \end{array}$$

Milchsäure wirkt aber, wie Satta nachgewiesen hatte, gleichfalls antiketoplastisch.

Die vierte, die Buttersäurereihe, ist für die Acetonkörper sicher die wichtigste, erwies sich doch die Buttersäure selbst als mächtiger Acetonbildner, sowohl im Stoffwechselversuch als bei Leberdurchblutung. Schutzenberger[4]) erhielt nun zwar bei der Spaltung des Eiweißes mit Barytwasser eine nicht näher bezeichnete Aminobuttersäure. Aber selbst wenn es sich hier um ein Abbauprodukt und kein Kunstprodukt handelt, würden wir annehmen, daß hier die α-Aminobuttersäure vorlag, da alle anderen

---

[1]) Deutsches Archiv f. klin. Medizin 76, 251 (1903).

[2]) Bezogen von Kahlbaum, Berlin.

[3]) Noorden und Embden, Zentralblatt f. d. ges. Physiol. und Path. des Stoffwechsels. N. F. 1, 4 (1906). Anm.

[4]) Bull. de la soc. chimique de Paris 23, 216 (1875).

Tabelle V.

Datum	Harnmenge ccm	Spez. Gewicht	N g	NH_3 g	Aceton im Urin g	Aceton in der Atemluft g	$FeCl_3$-Reaktion	Acetonkörpersumme als Oxybuttersäure g	Polarisation Proz. Z.	Bemerkungen
17. XI.	1200	1021	17,75	1,156	0,019	0,019	0	0,067	0	
18. XI.	1330	1021	19,99	1,224	0,201	0,060	0	0,457	0	
19. XI.	1100	1024	18,26	1,238	0,369	0,186	Spur	0,971	0	
20. XI.	1020	1027	19,26	1,442	0,555	0,209	+	1,337	— 0,1	
21. XI.	1450	1023	25,03	1,510	0,451	0,093	Spur	0,952	— 0,1	Zulage: 50 g Asparagin
22. XI.	1350	1025	25,70	1,360	0,545	0,121	+	1,155	— 0,1	" 50 " "
23. XI.	950	1026	19,21	1,469	0,675	0,278	+	1.668	— 0,1	
24. XI.	980	1024	18,26	1,346	0,611	0,269	+	1,540	0	

Tabelle VI.

Datum	Harnmenge ccm	Spez. Gewicht	N g	NH_3 g	Aceton im Urin g	Aceton in der Atemluft g	$FeCl_3$-Reaktion	Acetonkörpersumme als Oxybuttersäure g	Polarisation Proz. Z.	Bemerkungen
8. IX.	980	1024	17,30	1,904	0,650	0,380	+	1,803	0	
9. IX.	800	1026	16,58	1,673	0,680	0,329	+	1,764	0	Zulage: 20 g Glutamin-
10. IX.	1100	1022	18,76	1,523	0,601	0,260	+	1,507	0	säure.
11. IX.	1130	1023	18,65	1,428	0,461	0,218	+	1,188	0	
12. IX.	900	1027	16,86	1,347	0,476	0,204	+	1,190	0	

Aminosäuren des Eiweißmoleküls gleichfalls α-Aminosäuren sind. α-Aminobuttersäure und α-Oxybuttersäure bilden aber kein Aceton.

Die β-Oxybuttersäure hat sich sowohl in vivo als auch bei der Durchblutung der Leber als stärkster Acetonbildner erwiesen. Die ihr entsprechende β-Aminobuttersäure ruft nach Sternberg ein dem Coma diabeticum ähnliches Symptomenbild hervor und vermehrt nach Grube, der die Untersuchungen Sternbergs nachprüfte, die Ausscheidung der Acetonkörper. Daß die β-Aminobuttersäure, wie Sternberg annahm, zu den Bausteinen des Eiweißmoleküls gehört, ist außerordentlich unwahrscheinlich, da — wie erwähnt — unter den Spaltprodukten des Eiweißmoleküls nur α-Aminosäuren beobachtet worden sind.

Von der Buttersäure kommen wir zu der gleichfalls der vierten Reihe angehörenden zweibasischen Bernsteinsäure. Wir prüften das Asparagin[1]) $COOH{-}CHNH_2{-}CH_2{-}CONH_2$, das Amid der zweibasischen Asparaginsäure (Aminobernsteinsäure). (S. Tabelle V, S. 125). Auch diese zeigte bei der Durchblutung der Leber keine Vermehrung des Acetons (Embden, Salomon und Schmidt).

Das Asparagin zeigte also in unserem Versuche einen deutlich vermindernden Einfluß auf die Acetonkörperausscheidung; es verhält sich darin wie das Alanin.

Die zweibasische Aminosäure der fünften Reihe, die Glutaminsäure, haben wir gleichfalls geprüft. Sie hatte in Durchblutungsversuchen keinen Einfluß auf die Acetonkörperbildung in der Leber gezeigt. Der hier folgende Versuch mit Glutaminsäure[2]) wurde im Anschluß an den unten folgenden Leucinversuch angestellt. Wir glaubten daher, daß hier 2 Vortage genügten, da der Organismus schon 6 Tage vorher durch die kohlehydratfreie Kost sich auf eine bestimmte Acetonausscheidung eingestellt hatte. Aus Mangel an Material begnügten wir uns mit einem Versuchstage. (Tabelle VI.) Eine vermehrte Acetonkörperausscheidung trat in diesem Versuche nicht ein. Leider war die Acetonausscheidung am Versuchstage offenbar noch im Absinken, so daß der Versuch für die Beurteilung der Frage, ob die Glutaminsäure die Acetonkörperausscheidung herabsetzt, nicht verwertbar ist.

Das größte Interesse kommt aber dem Leucin zu, der Aminoisocapronsäure, $\substack{CH_3\\CH_3}{>}CH{-}CH_2{-}CHNH_2{-}COOH$. Durch die

[1]) Bezogen von Kahlbaum, Berlin.

[2]) Das Präparat stammte von Kahlbaum, Berlin.

Untersuchungen von Embden, Salomon und Schmidt war erwiesen, daß Leucin bei Leberdurchblutung Aceton bildet. Die Verfasser nehmen an, daß durch Abspaltung zwischen β- und γ-Kohlenstoffatom aus dem Leucin Aceton direkt entstehe. Allerdings konnten sie Milchsäure, die dann aus der anderen Hälfte der Leucinformel hätte entstehen müssen, nicht nachweisen. Einen anderen Weg des Abbaues nehmen Baer und Blum an, die nach Leucinfütterung an Diabetiker und Gesunde vermehrte Acetonkörperausscheidung konstatierten. Danach entsteht zunächst nach dem Gesetze, daß sich Fettsäurederivate mit Substitution am α-Kohlenstoffatom wie die nächst niederen Fettsäuren verhalten (Embden), Isovaleriansäure, aus dieser durch Substituierung einer Methylgruppe durch eine Hydroxylgruppe β-Oxybuttersäure:

$$\begin{array}{ccccc} CH_3\ CH_3 & & & & \\ \diagdown\diagup & & CH_3\ CH_3 & & CH_3\ OH \\ CH & & \diagdown\diagup & & \diagdown\diagup \\ | & & CH & & CH \\ CH_2 & \longrightarrow & | & \longrightarrow & | \\ | & & CH_2 & & CH_2 \\ C{<}^{H}_{NH_2} & & | & & | \\ | & & COOH & & COOH \\ COOH & & & & \\ \text{Leucin} & & \text{Isovaleriansäure} & & \beta\text{-Oxybuttersäure} \end{array}$$

Baer und Blum haben auf Milchsäure in ihren Versuchen nicht untersucht. Wir verfügen über einen Versuch mit Leucin, in dem auch auf Milchsäure untersucht wurde [1]).

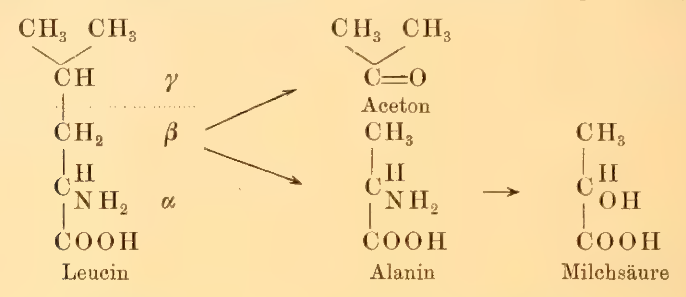
Tabelle VII.

Datum	Harnmenge ccm	Spezifisches Gewicht	N g	NH_3 g	Aceton im Urin g	Aceton in der Atemluft g	Fe Cl_3-Reaktion	Acetonkörpersumme als Oxybuttersäure g	Polarisation	Bemerkungen
2. IX.	1110	1023	19,32	0,979	0,025	0,019	Spur	0,077	0	
3. IX.	830	1027	19,26	1,034	0,180	0,088	„	0,469	0	
4. IX.	850	1027	19,21	1,251	0,383	0,153[1])	+	>0,938	0	
5. IX.	1060	1020	17,98	1,523	0,485	0,236	+	1,262	0	Zulage:
6. IX.	900[2])	1026	>16,86	1,890	>0,708	0,311	+	>1,783	0	28 g Leucin
7. IX.	1250	1019	17,14	1,999	0,897	0,404	+	2,277	0	30 g Leucin
8. IX.	980	1024	17,30	1,904	0,650	0,380	+	1,803	0	
9. IX.	800	1026	16,58	1,673	0,680	0,329	+	1,764	0	

[1]) Das Leucin wurde von uns nach einer uns durch persönliche Mitteilung bekannt gewordenen Methode von Embden aus käuflichem Kaseïn hergestellt.
[2]) Verlust.

Dieser Versuch zeigt, daß dem Leucin im Gegensatz zu den anderen untersuchten Aminosäuren in hohem Maße die Fähigkeit zukommt, die Acetonkörperausscheidung zu vermehren. Auch die Acetonausscheidung durch die Atemluft, die von Baer und Blum nicht berücksichtigt wurde, steigt an den Versuchstagen erheblich an.

Die Frage, ob das Leucin — wie Baer und Blum es wollen — über die Isovaleriansäure und Oxybuttersäure abgebaut wird, oder durch Spaltung der Leucinformel in der Mitte zerfällt, ist mit der Frage der Zuckerbildung aus Leucin eng verknüpft:



Würde nämlich die obere Hälfte der Leucinformel, wie es hier angegeben wurde, abgespalten und zu Aceton oxydiert werden, so müßte aus der unteren Hälfte Alanin und Milchsäure sich bilden. Embden hat nun bei seinen Durchblutungsversuchen vergeblich nach Milchsäure gesucht. Auch uns ist der Nachweis der Milchsäure als Zinklaktat in dem Urin der Leucintage nicht gelungen. Die Bildung von Milchsäure aus Leucin ist aber auch deshalb nicht wahrscheinlich, weil Leucin dann auch zu den zuckerbildenden Substanzen gehören müßte. Alanin sowohl wie Milchsäure gehören nämlich zu den Substanzen, die sich als hervorragende Zuckerbildner erwiesen haben (Embden und Salomon). Würde aus dem Leucin Alanin und Milchsäure entstehen, so müßte es also gleichfalls zu den Zuckerbildnern gehören. Nun existieren über Zuckerbildung aus Leucin einige Untersuchungen, alle mit der Absicht angestellt, eine Zuckerbildung aus Leucin zu beweisen. Diese Versuche haben ein negatives oder doch zweifelhaftes Resultat ergeben und nur zwei Versuche von Mohr an zwei schwer Diabetischen scheinen für eine Zuckervermehrung nach Leucinfütterung zu sprechen. Der erste Versuch findet sich bei Langstein[1]) zitiert, er ist — wie mir Herr Dr. Mohr auf Anfrage mitteilte — sonst nicht veröffentlicht. Danach war die Zucker-

[1]) Ergebn. d. Physiol. III, 1, S. 472 (1904.)

ausscheidung an drei Vortagen 49 bis 63 g, stieg an den Versuchstagen auf 72 bis 75 g, um an den Nachtagen auf 55 bis 59 g herunterzugehen. An den Versuchstagen wurde täglich 20 g Leucin gegeben; die beobachtete Mehrausscheidung von Traubenzucker betrug etwa 15 g täglich. Es läßt sich nun berechnen, daß aus dem zugeführten Leucin, wenn man an einen Abbau über Alanin und Milchsäure denkt, nur 12,5 g Zucker maximal hätten gebildet werden können. Die Mehrausscheidung von Traubenzucker an den Versuchstagen ist also — wenn der Versuch richtig wiedergegeben ist — auf andere, uns unbekannte Momente zurückzuführen, nicht auf das Leucin. Der andere Versuch von Mohr ist gleichfalls nicht ausführlich publiziert. Mohr gibt an [1]), daß hier die Zuckerausscheidung von durchschnittlich 44,7 g an den Vortagen, auf 53,7 g an den Leucintagen anstieg. Vergleichen wir damit seine Tabellen [2]), die wenigstens die Vortage noch enthalten, so geht daraus hervor, daß die Zuckerausscheidung an diesen Vortagen 60,32, 63,71, 71,27 g betrug. Der Versuch ist infolge dieser widersprechenden Angaben, also gleichfalls für die Frage der Zuckerbildung aus Leucin nicht verwertbar.

Von den anderen in Tabelle VII zusammengestellten Resultaten ist nicht ohne weiteres verständlich die N-Ausscheidung. Es zeigt sich nämlich, daß an den Leucintagen die N-Ausfuhr nicht ansteigt. Gegen die Annahme, daß das Leucin überhaupt nicht assimiliert worden sei, spricht der Umstand, daß die Acetonkörperausscheidung gestiegen ist und wir glauben — wie gesagt — daß sich das mehrausgeschiedene Aceton aus dem zugeführten Leucin gebildet habe. Nehmen wir den zweiten Tag der Nachperiode als Niveau der Acetonkörperausscheidung an, an dem 1,764 g als Oxybuttersäure ausgeschieden wurden — der vorhergehende Tag stand offenbar noch unter der Leucinwirkung — so wurden an den Leucintagen zusammen

$$\begin{array}{r} 1{,}783 \\ +\ 2{,}277 \\ -\ 1{,}764 \\ \hline =\ 2{,}296\ \text{g} \end{array}$$

Oxybuttersäure vermehrt ausgeschieden. Um diese zu liefern, müßten rund 3 g Leucin zersetzt worden sein mit 0,32 g Stickstoff. Da die Stickstoffausscheidung sogar noch niedriger ist als an den anderen Versuchstagen, so ist der Stickstoff des zersetzten

[1]) Zeitschr. f. klin. Med. 52, 350 (1904).
[2]) Ibid. S. 341.

Leucins offenbar retiniert worden. — Diese Überlegung spricht deutlich für die Unrichtigkeit der Anschauung, daß die N-Ausscheidung ein zuverlässiger Indikator für den Abbau N-haltiger Substanzen im Organismus sei. Nachdem der Beweis erbracht war, daß das Leucin zu den Muttersubstanzen der Acetonkörper zu zählen sei, mußte es also auch in den Stoffwechsel eingetreten und zersetzt worden sein, ohne daß die N-Ausscheidung anstieg.

Unter den übrigen aus unseren Untersuchungen hervorgehenden Befunden verdienen noch folgende Punkte eine Erläuterung. Die Acetonausscheidung durch die Atemluft war in allen Versuchen geringer als die durch den Urin. Dieser Befund steht in Widerspruch zu früheren besonders von Waldvogel gemachten Angaben, wonach beim Gesunden und leicht Diabetischen die Acetonausscheidung durch die Atemluft größer ist als die durch den Urin. Da wir mit dem Apparat von Waldvogel arbeiteten und alle von Waldvogel angegebenen Kautelen genau befolgten, glauben wir diese Differenzen auf individuelle Verschiedenheiten zurückführen zu müssen.

Einige Beachtung verdienen noch die Ammoniakwerte. Die Schlüsse, die wir aus unseren Analysen ziehen können, sind allerdings gering. Immerhin legt der Umstand, daß bei der durch Leucin bedingten Acetonkörpervermehrung die NH_3-Werte besonders hoch anstiegen, während eine durch Aminosäuren bedingte Verminderung der Acetonausscheidung eine Herabsetzung der NH_3-Werte nicht zur Folge hatte, die Vermutung nahe, daß die Aminogruppe in all diesen Fällen als Ammoniak zur Ausscheidung kam.

Unsere Untersuchungen konnten auf die höher zusammengesetzten Aminosäuren nicht übertragen werden; doch scheinen auch schon die hier mitgeteilten Versuche geeignet, die bisher bekannten Gesetze der Acetonkörperbildung zu bestätigen und zu erweitern.

Die Gesetze der Acetonkörperbildung sind zum großen Teile von Embden, Salomon und Schmidt erforscht, dann von Baer und Blum erweitert worden. Für den Abbau der Fettsäuren, Oxy- und Aminofettsäuren kommen folgende Gesetze in Betracht:

1. Bei der Bildung der Acetonkörper wird zuerst Oxybuttersäure gebildet, aus der sich durch weitere Oxydation Acetessigsäure und schließlich durch Abspaltung der Carboxylgruppe Aceton bildet (Minkowski).

2. Amino- und Methylgruppen, die an einem Kohlenstoffatom stehen, können durch ein Hydroxyl ersetzt werden; bei verzweigten Fettsäuren mit zwei endständigen Methylgruppen tritt an Stelle der einen CH_3-Gruppe ein Hydroxyl. (Oxybuttersäurebildung aus β-Aminobuttersäure und Isovaleriansäure.)

3. α-Oxy- und α-Aminosäuren verhalten sich wie die Fettsäuren der nächst niederen Reihe. (α-Aminovaleriansäure wie Buttersäure, Leucin wie Isovaleriansäure usw.)

4. Unverzweigte Fettsäuren mit gerader Zahl von C-Atomen und mit dem Radikal $—CH_2—CH_2—CH_2—COOH$ können in β-Stellung oxydiert und ev. so lange an der Stelle der Oxydation abgespalten und nun wieder in β-Stellung oxydiert werden, bis sie bis zur β-Oxybuttersäure abgebaut sind (Embden und Marx [1]). (Acetonkörperbildung aus Butter- und Capronsäure.) — Verzweigte Fettsäuren mit ungerader Zahl von C-Atomen werden anscheinend in derselben Weise abgebaut und führen dann auch zur β-Oxybuttersäurebildung. (Noch nicht erwiesener Analogieschluß.)

Verfolgen wir den nach diesen Gesetzen verlaufenden Abbau der Aminosäuren des Eiweißmoleküls, so sind es nur zwei Aminosäuren, die in der genannten Weise zur Oxybuttersäure und somit zur Acetonkörperbildung führen können: Leucin und Arginin.

1. Die Acetonkörperbildung aus Leucin wurde ausführlich besprochen; der Abbau erfolgt, wie auseinandergesetzt wurde, vermutlich über die Isovaleriansäure.

2. Eine Acetonkörperbildung aus Aminovaleriansäure wäre in folgender Weise denkbar:

$$
\begin{array}{l}
CH_3 \\
| \\
CH_2 \\
| \\
CH_2 \\
| \\
C\begin{smallmatrix}H \\ NH_2\end{smallmatrix} \\
| \\
COOH
\end{array}
\quad \longrightarrow \quad
\begin{array}{l}
CH_3 \\
| \\
CH_2 \\
| \\
CH_2 \\
| \\
COOH
\end{array}
\quad \longrightarrow \quad
\begin{array}{l}
CH_3 \\
| \\
C\begin{smallmatrix}H \\ OH\end{smallmatrix} \\
| \\
CH_2 \\
| \\
COOH
\end{array}
$$

Aminovaleriansäure — Buttersäure — β-Oxybuttersäure

Die Aminovaleriansäure muß sich ja wie die nächst niedere Fettsäure, die Buttersäure, verhalten. Die unter den Spaltungsprodukten

[1]) Kongreß für innere Medizin. München 1906.

des Eiweißmoleküls gefundene ist Aminoisovaleriansäure und verhält sich wie Isobuttersäure, kommt also für die Acetonkörperbildung nicht in Betracht. Die normale Aminovaleriansäure ist dagegen im Arginin enthalten, der Guanidin-α-amino-n-valeriansäure. Für den Abbau des Arginins ist folgende Möglichkeit gegeben:

$$\begin{array}{ccccc}
NH & & & & \\
\| & & & & \\
CNH_2 & & & & \\
| & & & & \\
NH & & NH_2 & & \\
| & & | & & \\
CH_2 & & CH_2 & & CH_3 \\
| & & | & & | \\
CH_2 & & CH_2 & & CH_2 \\
| & \longrightarrow & | & & | \\
CH_2 & & CH_2 & \longrightarrow & CH_2 \\
| & & | & & | \\
C{<}^{H}_{NH_2} & & C{<}^{H}_{NH^2} & & C{<}^{H}_{NH_2} \\
| & & | & & | \\
COOH & & COOH & & COOH \\
\text{Arginin} & & \text{Ornithin} & & \text{Aminovaleriansäure}
\end{array}$$

Für die Möglichkeit dieses Abbaues sprechen folgende Umstände: Arginin kann durch Kochen mit Barytwasser in Ornithin übergeführt werden; es kann umgekehrt aus Ornithin und Cyanamid synthetisch dargestellt werden (Schulze und Winterstein). Bei längerer Einwirkung der Arginase auf Protamin entstehen aus Arginin unter anderem Ornithin und Aminovaleriansäure (Kossel und Dakin). Die Abspaltung der endständigen Aminogruppe des Ornithins würde ein Analagon bilden zu der Umwandlung von Lysin in α-Oxycapronsäure (Langstein[1]). Wir waren nun leider nicht in der Lage, eine Acetonkörperbildung aus Arginin experimentell zu beweisen. Als wesentliche Stütze der hier geäußerten Anschauung müssen wir aber an ältere Versuche von Borchardt[2]) über vermehrte Acetonkörperausscheidung durch Protamin und Histon erinnern. Es gelang damals zum ersten Male nachzuweisen, daß es Eiweißkörper gibt, die die Acetonkörperausscheidung vermehren, vor allem Protamine und Histone. Der Grund, warum diese Eiweißkörper die Acetonkörperausscheidung nicht herabsetzen, konnte schon damals in dem Mangel dieser Eiweißstoffe an solchen Aminosäuren, die die Acetonkörperausscheidung vermindern, ge-

[1]) Ergebn. d. Physiol. III, 1, S. 475 (1904).

[2]) Archiv f. exp. Path. und Pharm. 53, 388 (1905).

funden werden. Es ist nun weiterhin zu bedenken, daß Protamine und Histone reicher an Arginin sind als sämtliche anderen Eiweißkörper. Protamin kann bis zu 85 Proz. Arginin enthalten, Histon immer noch etwa 15 Proz., während in den gewöhnlichen Eiweißkörpern nur etwa 5 Proz. Arginin sich findet. Danach scheint es uns wahrscheinlich, daß die durch Protamin- und Histondarreichung bewirkte Acetonkörpervermehrung auf dem hohen Gehalt dieser Substanzen an Arginin beruht. Diese Versuche stützen also die Annahme, daß das Arginin zu den Muttersubstanzen der Acetonkörper gehört.

Der Einfluß der anderen von uns untersuchten Aminosäuren auf die Acetonkörperausscheidung ist gewiß nicht ohne Interesse und gibt uns hinsichtlich einiger Stoffwechselfragen gewisse Aufschlüsse. Insbesondere muß hier hervorgehoben werden, daß nicht nur die Kohlehydrate selbst, sondern auch gewisse Oxysäuren, die die Ausscheidung der Kohlehydrate vermehren und vielleicht als direkte oder indirekte Zuckerbildner anzusehen sind, die Acetonkörperausscheidung herabsetzen. So war für die Milchsäure von Embden und Salomon[1]) bewiesen worden, daß sie die Zuckerausscheidung beim pankreasdiabetischen Hund vermehrt; Satta zeigte, daß Milchsäure die Acetonkörperausscheidung herabsetzt. Auch das Glycerin, das nach Hirschfeld und Satta die Acetonkörperausscheidung vermindert, ist durch die Versuche Lüthjes als Zuckerbildner bekannt. — Es ist nun wichtig zu betonen, daß sich diese Beziehungen zwischen Zuckerbildung und Acetonkörperausscheidung auf die von uns untersuchten Aminosäuren fast vollständig übertragen lassen. Embden und Salomon[1]) wiesen nach, daß Glykokoll, Alanin und Asparagin die Zuckerausscheidung des pankreasdiabetischen Hundes steigern; nach unseren Versuchen wirkten Alanin und Asparagin sicher, Glykokoll wenigstens im zweiten Versuch (der erste war wegen dyspeptischer Störung unregelmäßig verlaufen) vermindernd auf die Acetonkörperausscheidung. Über den Einfluß der Glutaminsäure auf die Zuckerausscheidung ist bisher noch nichts bekannt. — Jedenfalls sind wir berechtigt, nicht nur den Kohlehydraten, sondern auch den Kohlehydratbildnern einen vermindernden Einfluß auf die Acetonkörperausscheidung zuzusprechen.

[1]) Diese Beitr. 5 (1904) und 6 (1904/05).

X.

Über das Verhalten des Acetylglukosamins im Tierkörper.

Von **Kurt Meyer** (Straßburg i. E.).

Aus der zweiten medizinischen Klinik in München.

Als sich bei Fütterungsversuchen mit salzsaurem Glukosamin an Hunden und Kaninchen (Fabian, Offer und Fränkel) herausstellte, daß ein großer Teil der per os und besonders der subcutan gegebenen Substanz unverändert aus dem Körper ausgeschieden wird, glaubte man hierin einen gewissen Gegensatz zu sehen zu dem Verhalten des im Eiweißmolekül enthaltenen Glukosamins, das ja ohne Zweifel vollständig zur Verbrennung kommt. Man berücksichtigte hierbei jedoch zu wenig die quantitativen Verhältnisse. So sahen Offer und Fränkel nach Verfütterung von 10 g salzsauren Glukosamins bei Hunden 20 Proz. im Harn wiedererscheinen, und Fabian fand nach Eingabe von 15 g bei Kaninchen, abgesehen von den im Kot ausgeschiedenen Mengen, 2 bis 26 Proz. im Urin wieder, während andererseits eine Menge von 3 g vollständig verbrannt wurde. Rechnet man nun den Glukosamingehalt der gewöhnlichen Eiweißkörper der Nahrung zu 10 Proz., was gewiß viel zu hoch gegriffen ist, so würden die in den angeführten Versuchen zerstörten Glukosaminmengen Eiweißmengen von mindestens 10 g pro Kilogramm Tier entsprechen, Quantitäten, wie sie im normalen Stoffwechel niemals zur Verarbeitung kommen. Wenn bei subcutaner Zufuhr die Assimilationsgrenze erheblich niedriger liegt, in den Versuchen Bials [1]) z. B. bei glykogenfrei gemachten Kaninchen von 2 g subcutan eingespritzten Glukosamins bis 72,5 Proz. unverändert ausgeschieden wurden, so zeigt dies nur, daß der Körper auf einmal nur so kleine Mengen des salzsauren

---

[1]) Bial, Berl. klin. Wochenschr. 1905, Festnummer für Ewald, S. 67.

Glukosamins zu bewältigen vermag, wie sie ihm bei der allmählichen Resorption vom Darm aus zugeführt werden.

Die langsame Verbrennung des salzsauren Glukosamins erschwert die Entscheidung der Frage, ob der Abbau des Glukosamins über die Glukose erfolgt. Denn wenn auch Fabians Versuche an Kaninchen dafür zu sprechen schienen, das eine Glykogenbildung durch Verfütterung von Glukosamin nicht erzielt wird, so waren doch bei diesen Versuchen die nach Abzug der nicht resorbierten oder unverändert durch die Nieren ausgeschiedenen Mengen zum Abbau gelangten Glukosaminquantitäten schließlich so gering, daß ein negativer Ausfall nicht als absolut beweisend angesehen werden konnte. Beachtung verdienen dagegen die Erfahrungen Baumgartens [1]), der bei Diabetikern nach Eingabe von salzsaurem Glukosamin keine Steigerung der Zuckerausfuhr beobachtete; aus seinen Angaben läßt sich jedoch nicht ersehen, wie große Mengen Glukosamin unresorbiert mit den Fäces ausgeschieden wurden.

Vor kurzem hat nun Forschbach [2]) ein Glukosaminderivat dargestellt, das das Glukosamin amidartig an Kohlensäureester gebunden enthielt, und hat bei Fütterungsversuchen am pankreasdiabetischen Hunde einmal festgestellt, daß erhebliche Mengen dieser Substanz, mindestens 20 g bei einem 13 kg schweren Hunde, glatt verbrannt werden; andererseits konnte er aber keine Steigerung der Zuckerausscheidung konstatieren, so daß ein Abbau des Glukosamins über die Glukose durch seine Versuche sehr unwahrscheinlich gemacht wird.

Forschbach ging bei der Verwendung des Glukosaminkohlensäureesters von der Annahme aus, daß das Glukosamin in ähnlicher amidartiger Bindung auch im Eiweißmolekül verkettet sei. So naheliegend diese Annahme in Analogie zu der Verkuppelung der Aminosäuren miteinander auch erscheint, so sprechen andererseits doch manche Tatsachen, wie schon Fr. Müller hervorgehoben hat, dafür, daß das Glukosamin nicht nur im Chitin, aus dem Fränkel ja Acetylglukosamin isoliert hat, sondern auch in den Mucinen und wahrscheinlich auch im Eieralbumin in acetyliertem Zustande enthalten ist. Denn wenn auch für das Ovalbumin noch nicht wie bei den Mucinen die Abspaltung großer Essigsäuremengen bei der Säurezersetzung nachgewiesen ist, so hat Fr. Müller doch auch

---

[1]) Baumgarten, Zeitschr. f. exp. Path. und Ther. 2, 64.
[2]) Forschbach, Diese Beiträge 8, 313.

bei diesem wie bei den Mucinen nach Alkalibehandlung einen positiven Ausfall der Ehrlichschen Reaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd gefunden; allerdings ist nicht ersichtlich, ob sein Albuminpräparat sicher frei von Ovomucoid war. Bei weiterem Verfolgen der Aldehydreaktion fand Fr. Müller, daß Pentaacetylglukosamin sie ebenfalls gibt, und später ist das gleiche von O. Neubauer [1]) auch für das Monoacetylglukosamin nachgewiesen worden. Hierdurch wurde das Vorhandensein von Acetylglukosaminen in den genannten Substanzen sehr wahrscheinlich gemacht, und man würde also bei Darreichung von Acetylglukosamin den natürlichen Verhältnissen der Glukosaminzufuhr am nächsten kommen. Aus diesem Grunde schien es auch nach der Veröffentlichung der Forschbachschen Versuche nicht überflüssig, das Verhalten des Monoacetylglukosamins im Organismus einer Prüfung zu unterziehen.

Monoacetylglukosamin, $C_6H_{11}O_5 . NH . CO . CH_3$, ist von Breuer [2]) synthetisch dargestellt worden. Ich wich von Breuers Angaben insofern ab, als ich das nach seiner Vorschrift dargestellte freie Glukosamin nicht erst in großen Mengen Methylalkohols löste, sondern nur mit wenig Methylalkohol übergoß und dann Essigsäureanhydrid im Überschuß zufügte. Es tritt hierbei Lösung ein, und nach kurzem Schütteln, am besten auf der Maschine, fällt der größte Teil des Acetylglukosamins kristallinisch aus. Eine weitere Portion wird durch Fällung mit trockenem Äther gewonnen. Die Ausbeute beträgt etwa 90 Prozent.

Das so gewonnene Acetylglukosamin zeigte die von Breuer angegebenen Eigenschaften. Zum Zwecke der quantitativen Bestimmung stellte ich seine spezifische Drehung fest:

0,2717 g Acetylglukosamin, aus Methylalkohol umkristallisiert, in 15 ccm Wasser gelöst, drehten bei Natriumlicht im 1 dcm-Rohr + 0,65° (Mittel aus 10 Ablesungen). Hieraus ergibt sich die spezifische Drehung, das spezifische Gewicht der Lösung = 1 angenommen:

$$[\alpha]_D = + 36{,}33^0.$$

Es wurden mit dieser Substanz folgende Versuche ausgeführt:

Versuch 1. Kaninchen erhält subcutan 3 g Acetylglukosamin in 30 ccm Wasser gelöst. Der durch Auspressen gewonnene Urin der nächsten 24 Stunden dreht nach rechts, reduziert und gibt nach Kochen mit Lauge

---

[1]) O. Neubauer, Verh. d. Ges. deutscher Naturf. u. Ärzte, Cassel 2, 68 (1903).

[2]) Breuer, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 31, 2193.

die p-Dimethylaminobenzaldehydreaktion. Die Drehung entspricht einem Gehalt von 0,846 Proz. Acetylglukosamin in 150 ccm Urin = 1,27 g. Der Harn der nächsten 24 Stunden zeigt nur noch eine minimale Rechtsdrehung.

Versuch 2. Kaninchen erhält subcutan 3 g Acetylglukosamin. Der Urin der nächsten 24 Stunden zeigt das gleiche Verhalten wie in Versuch 1. Die Rechtsdrehung entspricht einem Gehalt von 1,22 g Acetylglukosamin. Der später entleerte Urin enthält keine drehende Substanz mehr.

Es ergibt sich aus beiden Versuchen, daß subcutan zugeführtes Acetylglukosamin recht schlecht vom Körper verwertet wird, wenn auch viel besser als salzsaures Glukosamin, wie sich aus dem Vergleich mit den oben angeführten Zahlen Bials ergibt. Die Rechtsdrehung im Urin bezog ich auf Acetylglukosamin, obgleich ich nicht mit voller Sicherheit ausschließen kann, daß auch etwa abgespaltenes salzsaures Glukosamin an ihr beteiligt war. Aus einer Portion des ersten Urins suchte ich das Acetylglukosamin zu isolieren, indem ich den Urin mit Bleizucker versetzte, wobei, wie ich mich überzeugte, Acetylglukosamin noch nicht ausgefällt wird, und die vom entstandenen Niederschlag abfiltrierte Flüssigkeit unter Überschuß von Ammoniak mit Bleiacetat behandelte. Der so gewonnene Niederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt, vom Schwefelblei abfiltriert, das Filtrat bei niedrigem Druck zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit siedendem Methylalkohol ausgekocht. Beim Einengen des Methylalkohols schieden sich Kristalle ab, die nach Laugespaltung intensive Aldehydreaktion gaben und die ich daher als Acetylglukosamin ansehen zu können glaube.

Ich verabreichte nunmehr das Acetylglukosamin per os:

Versuch 3. Kaninchen erhält mit der Schlundsonde 2 g Acetylglukosamin in ungefähr 20 ccm Wasser. In Urin und Fäces der nächsten 48 Stunden keine reduzierende Substanz. Aldehydreaktion negativ.

Vom Darm aus zugeführt wurde das Acetylglukosamin also besser verwertet. Da unter diesen Umständen die Frage der Zuckerbildung einer Prüfung zugänglich erschien, so verabreichte ich phloridzindiabetischen Kaninchen größere Mengen per os. So wenig Klarheit auch noch über das Wesen des Phloridzindiabetes herrscht, so haben doch die Versuche Cremers und seiner Mitarbeiter gezeigt, daß nach Zufuhr von Traubenzucker und Traubenzucker liefernden Substanzen eine Steigerung der Zuckerausfuhr stattfindet. Lusk[1]) sah z. B. nach Einführung von allerdings 20 g

[1]) Lusk, Zeitschr. f. Biol. 36, 82.

Glukose oder Fruktose den Quotienten Zucker : Stickstoff auf das 2- bis 3 fache ansteigen. Ob aber bei Körpern, die nur langsam abgebaut werden, also in der Zeiteinheit immer nur geringe Mengen Glukose in das Blut übertreten lassen, ein Gleichbleiben der Zuckerausfuhr im Sinne einer Nichtentstehung von Glukose mit absoluter Sicherheit gedeutet werden kann, muß noch dahingestellt bleiben, wie ja auch ein Ansteigen des Quotienten $\frac{D}{N}$ nicht ohne weiteres als beweisend für die direkte Bildung von Zucker aus eben der zugeführten Substanz angesehen werden kann. Immerhin aber schienen mir die Verhältnisse der Prüfung wert.

Bei der Erzeugung des Phloridzindiabetes hielt ich mich an die Vorschriften von Lusk. Nach eintägigem Hungern erhielten die Tiere täglich vor- und nachmittags je 1 g Phloridzin in 20 ccm 1 proz. Sodalösung gelöst subcutan bei fortdauernder Karenz. Der 24 stündige Urin wurde durch Auspressen gewonnen. Der Zuckergehalt wurde durch Bestimmung der Drehung vor und nach Vergärung festgestellt. Der Stickstoff wurde nach Kjeldahl bestimmt.

Versuch 4. Kaninchen, 2250 g:

Tag	Urinmen ccm	Drehung vor Vergärung	Drehung nach Vergärung	Zucker g	Stickstoff g	$\frac{D}{N}$
I	250	+ 1,33°	— 0,10°	3,03	0,77	3,96
II	200	+ 0,92°	— 0,29°	2,40	1,21	1,99
III	400	+ 0,89°	— 0,14°	4,08	2,23	1,83
IV	400	+ 0,30°	— 0,53°	3,64	2,66	1,37
					(2,22)	(1,64)

Zu Beginn des vierten Tages erhielt das Tier 7 g Acetylglukosamin in ungefähr 50 ccm Wasser mit der Schlundsonde. Die in Klammern gesetzten Zahlen für den vierten Tag bedeuten die nach Abzug des im Acetylglukosamin enthaltenen Stickstoffs sich ergebenden Werte für N und $\frac{D}{N}$. Unverändertes Acetylglukosamin ließ sich weder durch die Aldehydreaktion noch durch eine nach Vergärung bleibende Reduktion nachweisen. 26 Stunden nach Eingabe des Acetylglukosamins starb das Tier unter dem Bilde zunehmender Schwäche. Die Sektion ergab keine Anhaltspunkte für die Todesursache. Der Darminhalt wurde gesammelt und mit Wasser digeriert. Die Flüssigkeit reduzierte nicht und gab nicht die Aldehydreaktion.

Versuch 5. Kaninchen, 1950 g.

Tag	Urinmenge ccm	Drehung vor Vergärung	Drehung nach Vergärung	Zucker g	Stickstoff g	$\frac{D}{N}$
I	250	1,15°	— 0,43°	3,98	1,58	2,52
II	250	1,35°	— 0,31°	4,20	1,97	2,13
III	250	1,26°	— 0,02°	3,13	2,77	1,13 (?)
IV	250	0,49°	— 0,77°	3,12	2,65	1,18
					(2,14)	(1,46)

Zu dem Zuckerwert des dritten Tages ist zu bemerken, daß der Urin bei der Vergärung in ammoniakalische Gärung überging und daß bei der alkalischen Reaktion das ausgeschiedene Phloridzin zerstört wurde, wie aus dem Fehlen einer Linksdrehung nach der Vergärung hervorgeht. Nimmt man für die Phloridzinausscheidung das Mittel aus dem vorangehenden und dem folgenden Tage an, so erhöht sich die Zuckermenge und damit der Quotient $\frac{D}{N}$ um etwa die Hälfte. Betreffs der eingeklammerten Zahlen gilt das oben Gesagte. Am vierten Tage hatte das Tier 8 g Acetylglukosamin per os erhalten. Im Urin ließ sich nichts davon nachweisen. Das Tier starb auch bei diesem Versuch 25 Stunden nach der Eingabe der Substanz. Die Untersuchung des Darminhalts auf Acetylglukosamin hatte auch hier ein negatives Ergebnis.

Beide Versuchsreihen haben das Mißliche, daß die Versuchstiere die Verfütterung des Acetylglukosamins nicht hinreichend lange überlebten und daß daher der Einwand erhoben werden kann, der Stoffwechsel war im entscheidenden Augenblicke nicht mehr normal. Soweit aber die Verwertbarkeit des Acetylglukosamins in Frage kommt, scheint mir dieser Einwand nicht begründet zu sein. Es ist nicht anzunehmen, daß der Organismus bei Herabsetzung der Lebensvorgänge einen Körper besser anzugreifen vermag als unter normalen Verhältnissen. Wir dürfen also schließen, daß der Organismus langsam zugeführtes Acetylglukosamin in recht erheblichen Mengen so weit zu verändern vermag, daß es sich dem Nachweis entzieht. Daß diese Veränderungen in der Richtung des Abbaues liegen, darf wohl angenommen und vielleicht auch aus der relativen Steigerung der Stickstoffausscheidung gefolgert werden.

Hinsichtlich der Frage der Zuckerbildung müssen wir bei der Deutung unserer Zahlen vorsichtiger sein. Wir sehen hier in

beiden Versuchsreihen am letzten Tage ein Sinken des Quotienten $\frac{D}{N}$, und es scheint die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß die Zuckerausscheidung in der Niere, die ja beim Phloridzindiabetes eine gewisse Intaktheit des Parenchyms voraussetzt, gelitten habe. Dagegen aber spricht, daß die Stickstoffausfuhr anscheinend keine Störung erfuhr, und daß bei der mikroskopischen Untersuchung der Nieren im ersten Falle sich keine pathologischen Veränderungen nachweisen ließen, wahrscheinlich also hatte die Zuckerzufuhr zur Niere keine Steigerung erfahren. Mit der Reserve, die aus den oben erörterten Gründen geboten ist, dürfen wir es daher als unwahrscheinlich hinstellen, daß es beim Abbau des Acetylglukosamins intermediär zur Bildung von Glukose kommt, ein Ergebnis, das mit den Angaben Forschbachs in bestem Einklang steht. Über welche Stufen der Abbau verläuft, muß einstweilen unentschieden bleiben.

Herrn Prof. Fr. Müller spreche ich für die Erlaubnis, die Arbeit in seinem Laboratorium anfertigen zu dürfen, und für das ihr geschenkte Interesse meinen besten Dank aus, ebenso Herrn Dr. Otto Neubauer für die Anregung zu diesen Untersuchungen und vielfache Ratschläge.

XI.

Zur Kenntnis der Fermente der Placenta.

Von **M. Savarè** (Mailand).

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Dank den Untersuchungen zahlreicher Forscher[1]) weiß man, daß die Placenta in betreff ihres Gehaltes an mannigfachen, dem intermediären Stoffwechsel dienenden Fermenten den großen Drüsen des Tierkörpers anscheinend nicht nachsteht. Die einschlägigen Untersuchungen begannen mit dem Nachweis eines proteolytischen Fermentes, dann folgte die Auffindung einer Lipase, einer Diastase, eines glykolytischen Fermentes und schließlich der Oxydasen. Doch sind die Untersucher in einzelnen Punkten verschiedener Meinung. So leugnen Charrin und Goupil[2]) die Gegenwart eines eiweißspaltenden, Santi und Acconci[3]) die eines glyko-

[1]) Mathes, Über Autolyse der Placenta, Centralblatt für Gynäkologie 1901. — Ascoli, Centralblatt f. Physiologie 1902 und Zeitschr. f. physiol. Chemie 42. — Merletti, Ricerche e studi intorno ai poteri selettivi dell' epitelio dei villi coriiali. Rassegna di Ostetricia e Ginecologia 1903. Glicemia naturale etc. Atti Academ. Scienze med. nat. Ferrara 1905. — Resinelli, Sul potere emolitico e emoagglutinante del liquido amniotico. Atti Soc. ost. ginec. 5, III. Okt. 1901. — Hofbauer, Grundzüge einer Biologie der menschlichen Placenta, Wien und Leipzig, Braumüller. — Reineri, Sui fermenti solubili e sulla funzione digestiva della placenta. Atti Soc. d' Ostetr. e Ginec. 10, 196. — Ferroni, Sull' autolisi dell' utero puerperale. Annali d'Ostetr. e Ginec. 1905; Le ossidasi placentari. Annali d'Ostetr. e Ginec. 1906, Giugno. — Basso, Über Autolyse der Placenta. Arch. f. Gynäkologie 76. — Costa, Sull' attività lipolitica della placenta umana. Annali d' Ostetr. e Ginec. 1905. — Ballerini, Sul potere glicolitico della placenta. Soc. cult. d. scienze med. e nat. Cagliari 1906. — Viana e Bruzzo, Sul potere diastasico del tessuto placentare. La Ginecologia, fasc. 8, 1906.

[2]) Charrin et Goupil, Les ferments du placenta. Compt. rend. 142, 595 (1906).

[3]) Santi e Acconci, Sul comportamento delle soluzioni di glucosio nella circolazione artificiale della placenta. La Ginecologia 1904.

lytischen Enzyms, Bergell und Liepmann[1]) fanden keine echte, Fett und Lecithin spaltende Lipase, Mirto[2]) kein glykolytisches Ferment.

Der hier hervortretende Mangel an Übereinstimmung ließ mir eine Nachprüfung dieser Angaben wünschenswert erscheinen. Andererseits war meine Absicht, auf etwa in der Placenta vorhandene, noch nicht berücksichtigte Fermente zu achten, deren Anwesenheit für die Aufklärung des Stoffwechsels der Placenta, möglicherweise auch für die des Stoffaustausches von Mutter und Kind von Bedeutung sein konnten.

Ich habe meine Versuche mit ganz frischen menschlichen Placenten ausgeführt, die durch wiederholte Injektion von physiologischer Kochsalzlösung in die Nabelgefäße von Blut möglichst befreit waren.

Herrn Prof. Fehling, Direktor der Straßburger Frauenklinik, der mir in liberalster Weise das frische Untersuchungsmaterial zur Verfügung stellte, bin ich für sein Entgegenkommen zu bleibendem Danke verpflichtet.

Meine Resultate seien nachstehend kurz zusammengefaßt.

Ich konnte die Gegenwart von proteolytischem und amylolytischem Ferment, von Monobutyrinase und von direkten und indirekten Oxydasen bestätigen. Hingegen gelang mir nicht der Nachweis einer Invertase, obgleich ich alle bekannten Methoden der Fermentdarstellung versuchte und die Dauer der Einwirkung der Fermentlösung auf Rohrzucker auf mehrere Tage ausdehnte. Auch die Umwandlung des nach Bottazzi[3]) in erheblicher Menge in der Placenta auftretenden Glykogens in Maltose war durch entblutetes Placentagewebe nicht zu erzielen. Sie wird anscheinend nur durch das im Blut enthaltene Ferment bewirkt. Negativ war auch das Ergebnis der Prüfung auf Tyrosinase, deren Nachweis im Hinblick auf die Beobachtungen von v. Fürth und Schneider[4]) vielleicht das Auftreten von abnormer Pigmentierung bei Schwangeren hätte erklären können.

---

[1]) Bergell und Liepmann, Über die in der Placenta enthaltenen Fermente. Münch. med. Wochenschr. N. 46, 1905.

[2]) Mirto, Sul comportamento delle soluzioni di glucosio in presenza del tessuto placentare. Communic. alla Soc. Milanese di Medicina e Biologia. Annali di Ostetr. e Ginec. Maggio 1906.

[3]) Bollettino dell R. Acad. Medica die Genova XVIII, N. 3. Ricerche della compositione chimica della Placenta umana.

[4]) Diese Beiträge 1, 229.

Die Versuche, Aldehydase nachzuweisen, deren Anwesenheit in der Placenta von Hofbauer und von Ferroni dargetan ist, gaben mir insofern kein ganz befriedigendes Resultat, als die Menge der schließlich erhaltenen Salicylsäure oft so gering war, daß man an dem positiven Charakter der Reaktion zweifeln konnte.

Die nach Jacoby mit Hilfe von Uranacetat dargestellte oder einfach durch Extraktion erhaltene Fermentlösung wurde mit Salicylaldehyd, der von Salicylsäure frei war, in bestimmter Menge versetzt und ohne Zusatz eines Antiseptikums — da der Aldehyd an sich antiseptisch wirkt — einige Stunden bis 5 Tage bei 38° stehen gelassen. Besonderes Gewicht wurde auf die vorherige völlige Entfernung von unverändertem Salicylaldehyd gelegt. Die alkalische Lösung wurde erst mit Äther bis zum Verschwinden der vom Aldehyd bedingten Eisenreaktion (im Ätherextrakt) ausgezogen, nun mit Phosphorsäure oder Schwefelsäure angesäuert und neuerlich mit Äther extrahiert. Nur das Vorhandensein der Salicylsäurereaktion in diesem Extrakt wurde als Beweis für die Anwesenheit von Aldehydase angesehen.

Wie erwähnt, war die erhaltene Reaktion nur schwach, viel schwächer, als sie nach von mir ausgeführten Vergleichsversuchen unter gleichen Bedingungen aus Leber oder Lungen zu erhalten ist.

Ich komme nun zu bisher nicht untersuchten Fermentwirkungen, die eine ausführlichere Darstellung erheischen.

Verschwinden der Glyoxylsäure.

Wie Schloß[1]) nachgewiesen hat, besitzen zerkleinerte Organe das Vermögen, zugesetzte Glyoxylsäure zum Verschwinden zu bringen. Diese Veränderung war weitaus am raschesten durch Leberbrei zu erzielen, dann folgten in absteigender Reihe Gehirn, Niere, Muskeln. Lunge und Milz hatten nur geringe Wirkung, Blut anscheinend gar keine. Welche Art von Veränderung da vorliegt, ob eine Oxydation, wie am nächsten liegt, oder aber eine andere chemische Umwandlung, ist unaufgeklärt. Da die Placenta funktionell in mehrfacher Richtung der Leber vergleichbar ist, lag es nahe, auch die Einwirkung von Placentagewebe auf Glyoxylsäure zu untersuchen. Ich ging dabei vor wie Schloß:

Frische Placenta wurde durch Injektion von mehreren Litern physiologischer Kochsalzlösung in die Nabelgefäße von Blut befreit, dann in einen feinen Brei übergeführt. Zu einer bestimmten Menge (25 g) wurden einige Kubikzentimeter einer Lösung von Glyoxylsäure von bekanntem Gehalt, dann einige Tropfen Toluol zugefügt und die Masse verschieden lange im Brutofen belassen. Zum Nachweis der Glyoxylsäure benutzte ich das von Schloß ausgearbeitete Verfahren, Behandlung mit Trichloressigsäure, dann Prüfung des Filtrats mit Indollösung und konzentrierter Schwefelsäure.

---

[1]) Diese Beiträge 8, 445.

Versuch 1. 25 g Placentabrei werden mit 0,01 g Glyoxylsäure in 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung und einigen Tropfen Toluol versetzt. Die gut gemengte Masse wird zu vier Proben verwendet, wovon die eine als Kontrollprobe sofort zur Verarbeitung kommt, die übrigen nach 10-, 18- und 24 stündigem Stehen. Die Glyoxylsäurereaktion in den enteiweißten Flüssigkeiten ergibt:

nach 10 stündiger Digestion: eine geringe Abweichung gegen die Kontrollprobe;
„ 18 „ „ deutliche Abschwächung;
„ 24 „ „ eine weitere Abschwächung.

Versuch 2. Anordnung wie im Versuch 1, nur ist der Zusatz der Glyoxylsäure halb so groß (0,005 g) und die gesamte Masse wird in fünf Proben geteilt, deren eine als Kontrollprobe dient, die vier anderen nach ungleicher Digestionszeit zur Untersuchung gelangen. Die Indolreaktion ergibt:

nach 12 Stunden: deutliche Abschwächung;
„ 16 „ starke Abschwächung. Blaßroter Farbenring, der nur langsam auftritt;
„ 20 „ die Reaktion kaum wahrnehmbar;
„ 24 „ die Reaktion tritt auch nach vierstündigem Stehen nicht auf.

Versuch 3. Anordnung wie oben, aber mit bloß 0,025 g Glyoxylsäure:
nach 6 Stunden: äußerst schwache Indolreaktion;
„ 12 „ nach einiger Zeit kaum wahrnehmbare Reaktion;
„ 18 „ keine Reaktion.

Die Placenta vermag sonach, wie Leber, Gehirn usw., eine Umwandlung der Glyoxylsäure zu bewirken. Nach den angestellten Proben zu schließen, ist ihre Wirkung geringer als jene der Leber, aber stärker als jene von Gehirn, Muskeln usw.

Schloß hat darauf hingewiesen, daß die Intensität der Glyoxylsäureveränderung in den einzelnen Organen einigermaßen (doch nicht vollständig) dem Gehalt an Aldehydase parallel geht. Aus meinen Befunden ergibt sich beim Vergleich mit den Resultaten Ferronis, daß die Menge der gebildeten Salicylsäure annähernd der gleichen Größenordnung angehört, wie bei mir die verschwundene Glyoxylsäuremenge. Doch sind die Daten für einen genaueren Vergleich schon wegen der individuellen Verschiedenheit der verwendeten Placenten unzureichend. Für weitere physiologische Schlußfolgerungen ist vor allem Aufklärung über den Prozeß erwünscht, durch den die Glyoxylsäure zum Verschwinden gebracht wird. Im hiesigen Institut im Gange befindliche Versuche sollen über diesen Punkt Aufklärung bringen.

Fibringerinnung.

Nach Cocchi, Acconci und Bottazzi erzeugt die Injektion des Nukleoproteïds der Placenta in die Blutbahn des Kaninchens stets Blutgerinnung, eine Wirkung, die allerdings auch den Nukleo-

proteïden anderer Organe zukommt. Es ist hier nicht der Ort, auf die Frage einzugehen, ob die Nukleoproteïde überhaupt an dem Aufbau der Enzyme beteiligt sind, wie von mancher Seite angenommen wurde. Wohl aber schien es von einigem Interesse festzustellen, ob sich in der Placenta ein Ferment findet, das imstande wäre, die Gerinnung des Blutes in den Uterusgefäßen nach der Geburt zu befördern. Auch hier liegt dann weiter die Schwierigkeit vor zu entscheiden, ob sich das etwa gefundene Ferment in dem Gewebe der Placenta selbst oder in dem darin zurückgehaltenen Blute findet. Da es nach meinen Erfahrungen nicht gelingt, die Durchspülung der Placenta von den Nabelgefäßen aus über eine gewisse Grenze zu treiben, ohne den Fermentgehalt des Organs zu schädigen, auch für den Fall, daß die Entfernung des Blutes vollends gelingt, ferner das Zurückbleiben von Fermentspuren an den Gefäßwandungen nicht ganz sicher ausgeschlossen werden kann, so haben meine einschlägigen Versuche nur einen relativen Wert.

Als Material der Gerinnungsversuche bediente ich mich einer Fibrinogenlösung, die nach dem von Heubner angegebenen und von Morawitz mit Erfolg für ähnliche Versuche angewandten Verfahren dargestellt war. Das durch wiederholte Halbsättigung mit Kochsalz von Globulin befreite Fibrinogen gab eine Lösung, die, sich selbst überlassen, auch bei tagelangem Stehen nicht koagulierte. Wurden nun 5 ccm davon auf 10 g zerhackte bluthaltige Placenta gegossen, so trat bei 37° die Koagulation im Durchschnitt von vier Proben in $1^1/_2$ Stunden ein. Brachte man die Fibrinogenlösung unter gleichen Bedingungen auf Brei von sorgfältigst von Blut befreiter Placenta, so trat die Gerinnung nach 3 Stunden ein. Die bluthaltige Placenta besitzt sonach eine gewisse Gerinnungswirkung, sie verdankt sie aber anscheinend ganz dem darin enthaltenen Blute. Wichtig wäre es, zu entscheiden, ob eine Verschiedenheit in der gerinnungserregenden Wirkung des mütterlichen und des Placentarblutes besteht, eine Frage, der ich noch nicht nähergetreten bin.

Desamidase.

Da S. Lang[1]) das ausgebreitete Vorkommen einer Desamidase, d. h. eines Fermentes, das die NH_2-Gruppe verschiedener Amide, Amine und Aminosäuren in Ammoniak überführt, in den tierischen

[1]) Diese Beiträge 5, 323.

Geweben nachgewiesen hat, ergab sich die Frage, ob eine solche Fermentwirkung auch dem Placentargewebe zukommt. Dabei kann die physiologisch bedeutungsvolle Frage, in welcher Beziehung diese Desamidierung zur Harnstoff- und Kohlehydrat- bzw. Fettbildung steht, zunächst ganz beiseite gelassen werden. Als typische Repräsentanten von NH_2 abgebenden Stoffen verwendete ich Glykokoll, Asparagin und Glykosamin. Vom Placentabrei kamen 50 g in Verwendung, von den zu spaltenden Substanzen je 0,5 g. Die Versuchsanordnung und die Methode der Bestimmung des Ammoniaks war die von Lang[1]) angewandte, so daß ich mich hier begnügen kann, auf seine Darstellung zu verweisen.

Nachstehend lasse ich die mit Glykokoll und Asparagin ausgeführten Versuche tabellarisch folgen:

Versuchs-Nr.	Dauer der Digestion Tage	mg N, abgespalten		
		ohne Zusatz	mit 0,5 g Glykokoll	mit 0,5 g Asparagin
1	14	8,80	20,12	28,34
2	10	8,42	16,24	26,88
3	12	6,24	18,36	30,40
4	19	11,37	17,10	48,44
5	30	12,60	15,68	39,48

In einem weiteren Versuche (Versuch 6) wurde neben Asparagin auch das Verhalten gegen Glykosaminchlorhydrat geprüft.

Probe a) wurde ohne Zusatz gelassen.

Probe b) wurde mit 0,5 g Glykosaminchlorhydrat versetzt und das Gemenge während der Digestion bei schwach alkalischer Reaktion erhalten

Probe c) mit 0,5 g Glykosamin versetzt, ohne Neutralisation.

Probe d) mit 0,5 g Asparagin.

Nach 16 Tagen gab a) 10,64 mg N; b) 24,36 mg N; c) 16,84 mg N; d) 36,40 mg N.

Nach dem Ergebnis dieser Versuche kommt der Placenta eine ausgesprochene desamidierende Wirkung zu, die, wie nach der Analogie mit Langs Resultaten zu erwarten war, beim Asparagin besonders deutlich hervortritt, aber auch beim Glykokoll und Glykosamin ausgesprochen ist. Ein Vergleich mit der desamidierenden Wirkung anderer Organe, sowie ein Schluß auf die Größe der Wirkung im intakten Organ ist leider nicht gestattet, da,

---

[1]) Ich habe stets unter Verwendung von Toluol als Antiseptikum gearbeitet.

wie Lang gezeigt hat, die Anwesenheit des Toluols die Fermentleistung sehr merklich herabsetzt.

Erepsinwirkung.

Die Wirkung des Cohnheimschen Erepsins[1]) ist im wesentlichen bisher durch die Überführung von Verdauungsprodukten, die die Biuretreaktion geben, in „abiurete“ Spaltungsprodukte charakterisiert. Solche Erepsinwirkungen sind nach Vernon[2]) bei tierischen Organen sehr verbreitet, es war daher auch an das Vorhandensein eines Erepsins in der Placenta zu denken.

Zum Nachweis benutzte ich die vom Blut befreiten, mit Quarzsand fein zerriebenen Placenten. Wird dieser Brei mit $^1/_4$ seines Volumens an physiologischer Kochsalzlösung angerührt, dann im Schüttelapparat etwa 2 Stunden geschüttelt, so zeigt die von den geformten Bestandteilen getrennte Flüssigkeit Erepsinwirkung. Diese Trennung läßt sich annähernd durch 12stündiges Stehen, Abheben und Filtrieren erzielen. Doch bleibt die eiweißreiche Flüssigkeit trotz Filtrierens trübe. Klare, aber weniger wirksame Lösungen erhält man durch Behandlung mit Uranacetat nach Jacoby[3]) und Rosell[4]). Man fällt das schwach alkalisch gemachte Präparat mit Uranylacetat, bringt den Niederschlag aufs Filter, verteilt ihn nach dem Abtropfen in 0,2 proz. Sodalösung, läßt 12 Stunden stehen und filtriert. Das klare Filtrat ist relativ arm an Eiweiß, was für die anzustellende Reaktion von Vorteil ist.

In meinen Versuchen brachte ich 100 ccm einer solchen Fermentlösung mit 2 bis 10 ccm einer Witte-Peptonlösung von 1 Proz. zusammen. Ein Teil der ursprünglichen Lösung diente bei Anstellung der Biuretreaktion als Vergleichsflüssigkeit. Der größere Teil wurde in den Brutschrank gebracht und sein Verhalten bei der Biuretreaktion an von Zeit zu Zeit entnommenen Proben untersucht. (Siehe Tabelle auf folgender Seite.)

Man darf danach der Placenta eine ausgesprochene Erepsinwirkung zusprechen.

Leider ist die Stellung des Erepsins zu anderen auf Proteïde und deren Abbauprodukte wirkenden Fermenten, so zu dem pro-

---

[1]) Cohnheim, Die Umwandlung des Eiweiß durch die Darmwand. Zeitschr. f. physiol. Chemie 33 (1901). — Nakayama, Über das Erepsin. Ebenda 41.

[2]) Journ. of. Physiol. 32, 33.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chemie 30, 135.

[4]) M. Rosell, Über Nachweis und Verbreitung intracellulärer Fermente. Dissert. Straßburg 1901.

teolytischen Ferment der Autolyse und zur Desamidase, so wenig geklärt, daß es vorläufig nicht angeht, einen sicheren Schluß zu ziehen, ob diese drei beobachteten Enzymwirkungen auf ebensoviele spezifische Fermente zu beziehen sind, oder ob eine einfachere Auffassung gestattet ist.

Versuchs-Nr.	Zugesetzte Peptonlösung ccm	Biuretreaktion				
		nach 2 Stunden	nach 4 Stunden	nach 6 Stunden	nach 10 Stunden	nach 12 Stunden
1	10	schwache Abnahme	—	deutliche Abnahme	Reaktion sehr schwach	—
2	5	—	deutliche Abschwächung	noch stärkere Abschwächung	—	Reaktion eben noch vorhanden
3	2	—	—	sehr starke Abnahme, Reaktion wenig deutl.	—	Reaktion fehlt ganz

Nach dem Mitgeteilten ist die Liste der in der Placenta nachweisbaren Fermentwirkungen eine recht reichhaltige. Danach steht außer Frage, daß die Placenta eine sehr mannigfaltige und eingreifende chemische Tätigkeit entwickeln kann. In welchem Umfange sie aber von diesem Vermögen Gebrauch macht, ist nicht zu übersehen. Ein Teil der ermittelten Fermentwirkungen: Proteolyse, Erepsinwirkung, Desamidase, dient möglicherweise nur postmortalen Vorgängen; ein anderer Teil: Oxydasewirkung, diastatische Wirkung, dient vermutlich in erster Linie dem Stoffwechsel des Placentargewebes. Ein zwingender Grund zu der Annahme, daß die vorhandenen Fermentwirkungen dem Stoffwechsel des Kindes zugute kommen, ist nicht gegeben. Freilich ist vom Gesichtspunkte der Zweckmäßigkeit ganz unverständlich, warum die Placenta, wenn sie in der Tat nur einen osmotischen Apparat für Austausch von Mutter- und Fötalblut darstellte, einen anatomisch und chemisch so komplizierten Bau besitzt. Man wird aber, um hier Sicherheit zu gewinnen, sich nicht auf mehr oder weniger plausible Schlußfolgerungen aus dem bisher Ermittelten beschränken dürfen, sondern nach neuen Angriffspunkten für die Untersuchung der funktionierenden Placenta suchen müssen.

XII.

Zur Frage der Labgerinnung der Milch.

Von Dr. med. **B. Slowtzoff** (Petersburg).

Die eben erschienenen Untersuchungen von Petry[1]) und Spiro[2]) veranlassen mich, kurz in deutscher Sprache über Versuche zu berichten, die ich schon im März 1905 in der Gesellschaft der russischen Ärzte mitgeteilt habe. Das Ergebnis dieser Versuche stimmt sehr gut mit dem Befunde von Petry, wonach die Bildung von Molkeneiweiß nicht im Moment der Parakaseïnausscheidung stehen bleibt, sondern darüber hinaus kontinuierlich fortschreitet.

Ich stellte meine Versuche mit nach Hammarsten dargestelltem Kaseïn an.

Der durch Essigsäure aus fünffach verdünnter Magermilch gefällte und gut ausgewaschene Kaseïnniederschlag wurde durch wiederholtes Lösen in 0,5 proz. Natriumphosphatlösung, Abfiltrieren des Fettes und Ausfällen mit Essigsäure gereinigt.

Zu den Versuchen dienten Lösungen dieses Kaseïns in 0,5 proz. Natriumphosphatlösung, die bis 50° erwärmt und langsam mit dem gleichen Volum von 0,44 proz. Calciumchloridlösung vermischt wurden. Die so erhaltenen, milchig getrübten Lösungen wurden durch zugefügtes Lab sehr leicht koaguliert.

Die Bestimmung des bei der Labgerinnung entstehenden Molkeneiweißes geschah so, daß in einer Probe der Kaseïnlösung das Kaseïn durch Essigsäure, in einer zweiten und dritten Probe das Parakaseïn durch Lab gefällt wurde, wobei der Parakaseïnniederschlag der zweiten Probe sofort, jener der dritten Probe erst nach 24 Stunden aufs Filter kam. Kaseïn- und Parakaseïnniederschläge wurden mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen, bei 110° getrocknet und gewogen.

Bei den ersten Versuchen ergab sich nun, daß zur Prüfung der proteolytischen Wirkung einer Lablösung zweckmäßig nur

---

[1]) Diese Beiträge 8, 339.

[2]) Ebenda 8, 365.

gekochte Kaseïnlösungen zu verwenden sind. Die Menge des nach 24 Stunden erhaltenen Parakaseïns war nämlich stets geringer als die sofort erhaltene. Es hatte sonach eine Lösung des Parakaseïngerinnsels stattgefunden, die ebensowohl von einem proteolytischen, dem Kaseïn anhaftenden Ferment, als von einer analogen Wirkung der Lablösung abhängen konnte.

Zur Entscheidung dieser Frage wurden je zwei Proben möglichst frischer Kuhmagermilch, die eine roh, die andere aufgekocht, beide aber mit Thymol versetzt, im Thermostaten bei 40° gehalten und täglich auf ihren Kaseïngehalt untersucht.

Es ergab sich z. B. in einem Versuche folgendes:

Dauer der Digestion	Kaseïn in 20 ccm	
	gekochter Milch	frischer Milch
Stunden	g	g
—	0,5558	0,5558
24	0,5582	0,4780
62	0,5420	0,4790
120	0,5500	0,4568
144	0,5640	0,4566

Diese Abnahme des Kaseïngehalts der Milch bei 40° steht in Übereinstimmung mit Beobachtungen von Konuches[1]), der die Menge des Kaseïns im frisch gemolkenen und aseptisch im Thermostaten digerierten Kolostrum bestimmte. Er fand z. B. die Menge des Kaseïns im Kolostrum:

in Versuch	gleich nach dem Melken	nach 1½ Stunden	nach 3 Stunden	nach 44 Stunden
	g	g	g	g
7	5,178	4,909	4,526	3,816
8	1,997	1,853	1,645	1,186
9	2,738	2,506	2,251	2,002
10	2,523	2,046	1,866	1,736

Ähnliche Resultate kann man an reinen Kaseïnlösungen bei Digestion im Thermostaten, und zwar auch bei Thymolzusatz, erhalten, wie denn schon Edkins[2]) vor längerer Zeit angegeben hat, daß sich nach Hammarstens Methode erhaltene Kaseïnlösungen beim Stehen verändern.

[1]) Dissertation Petersburg. Russisch.
[2]) Journ. of Physiology 12, 193.

Um den ständigen Einfluß dieses dem Kaseïn anhaftenden Fermentes auf die etwaige proteolytische Wirkung des Labs auszuschalten, wurde in späteren Versuchen die verwendete Kaseïnlösung stets aufgekocht.

In der folgenden Zusammenstellung sind einerseits die Mengen des Kaseïns in 20 ccm Milch, andererseits jene des sofort und des nach 24 Stunden erhaltenen Parakaseïns[1]), sodann die sich daraus berechnenden Molkeneiweißmengen in Gramm und Prozenten des Kaseïns angegeben. Die verwendeten Labpräparate sind als A, B und C bezeichnet:

Versuchs-Nr.	Labpräparat	Kaseïn	Sofort untersucht			Nach 24 Stunden		
			Para-kaseïn	in Lösung geblieben		Para-kaseïn	in Lösung geblieben	
		g	g	g	Proz.	g	g	Proz.
3	A	0,1590	0,1432	0,0158	9,93	0,060	0,0990	62,3
4	C	0,8320	0,8086	0,0234	2,81	0,502	0,3300	39,7
5	A	0,1122	0,1000	0,0122	10,87	0,0304	0,0818	72,8
6	B	0,2630	0,2167	0,0463	17,61	0,1678	0,0952	36,2
7	B	0,2700	0,2320	0,0380	14,08	0,1798	0,0902	33,4
8	B	0,3642	0,2820	0,0822	22,57	0,1524	0,2118	60,9
9	C	0,1150	0,1120	0,0030	2,61	0,0968	0,0182	15,8
10	C	0,4580	0,4480	0,0100	2,00	0,3730	0,0850	18,5

Versuchs-Nr.	Kaseïn in 20 ccm	Parakaseïn ohne HCl-Zusatz erhalten	Parakaseïn nach Zufügen von HCl erhalten
	g	g	g
3	0,1590	0,1432	0,1590
6	0,2630	0,2167	0,2623
7	0,2700	0,2320	0,2642

Wie man sieht, beträgt die Menge des gelöst gebliebenen Kaseïnanteils unmittelbar nach der Gerinnung 2,0 bis 22,57, im Mittel 9,76 Proz. Für die einzelnen Labpräparate sind aber die Schwankungen viel geringer, für A 9,93 bis 10,87 Proz., für B 14,08 bis 22,57 Proz., für C 2,00 bis 2,81 Proz.

Die Bestimmung des Parakaseïns 24 Stunden nach der Labgerinnung ergibt ferner durchweg eine erhebliche Vermehrung des in Lösung gegangenen Anteils, doch ist auch diese nicht

[1]) Einen beachtenswerten Einfluß auf die Kaseïngerinnung zeigte ein minimaler Salzsäurezusatz. Wurde vor dem Labzusatz eine Spur Salzsäure (bis 0,01 Proz.) zugefügt, so war die Parakaseïnabscheidung vollständiger und entsprach fast genau der Kaseïnmenge.

konstant. Sie schwankt zwischen 15,8 bis 72,8 Proz. und zeigt wiederum eine deutliche Abhängigkeit von dem verwendeten Labpräparat. Lab A ist hier das am stärksten, Lab C das am schwächsten wirksame.

Das zugefügte Lab hatte sonach in allen Fällen neben der koagulierenden eine eiweißlösende Wirkung. Daß es sich dabei nicht um einfache Pepsinwirkung handelt, geht daraus hervor, daß die Labpräparate in nicht angesäuerter Lösung auf Eiweiß und Leim nur minimale Einwirkung zeigten (etwa 1 mm Mett in 60 bis 70 Stunden). Die Labwirkung im Sinne der Pawlowschen Schule auf die reversible Wirkung des vorhandenen Pepsins zurückzuführen, geht auch nicht an, da alle reversiblen Reaktionen unter gleich gehaltenen Bedingungen zu einem Gleichgewicht führen, während in unserem Falle im Beginn fast alles Kaseïn koagulierte und dann sich fast zu zwei Drittel wieder löste.

Daß die proteolytische Wirkung fermentativer Natur ist, wird durch die Tatsache gestützt, daß sie durch Erhitzen der eben geronnenen Probe aufgehoben oder doch stark gehemmt wird. So nahm z. B. im Versuch 10 der bei der Labgerinnung gelöst gebliebene Anteil (0,0850 g) nach dem Aufkochen und 24stündiger weiterer Digestion nur um 0,0008 g zu, während die Zunahme sonst 0,0750 g betrug.

Sonach enthalten die Lablösungen entweder zwei verschiedene Fermente, ein koagulierendes, das sofort, und ein proteolytisches, das nur allmählich zur Wirkung gelangt, oder man muß mit Sawjalow annehmen, daß die Labgerinnung nur den ersten Schritt bei der Verdauung des Kaseïns darstellt.

XIII.

Über den Nachweis einiger Enzyme in dem Fruchtkörper der Lohblüte (Fuligo varians).

Von Dr. **H. Schroeder,**
Assistent am botanischen Institut der Universität Bonn.

Erste Mitteilung.

Daß bei der Fülle der chemischen Umsetzungen im lebenstätigen Organismus Enzyme in ganz hervorragender Weise mitwirken, darf heute als feststehende Tatsache angesehen werden, ebensowohl auch die daraus resultierende Folgerung, daß in der Einzelzelle eine sehr große Anzahl der verschiedensten Fermente nebeneinander vorkommen kann und auch in der Tat vorkommt.

Ich entnehme einem Vortrage Hofmeisters[1]), in dem diese Gedanken klar formuliert und weiter ausgeführt sind, die Angabe, „daß derzeit für die Leberzelle nachgewiesen sind: eine Maltase, eine Glykase, ein proteolytisches, ein Nukleïne spaltendes Ferment, eine Aldehydase, eine Lakkase, ein Ferment, das fest gebundenen Stickstoff der Amidosäuren in Ammoniak überführt, ein Fibrinferment und mit einiger Wahrscheinlichkeit eine Lipase und ein labähnliches Ferment“. Also sind mit Sicherheit erkannt neun verschiedene Enzyme und zwei weitere sehr wahrscheinlich gemacht.

Ebenso ist nach mündlicher Mitteilung von Herrn Professor Hofmeister auch in den Leukocyten des Pferdeblutes eine große Anzahl von Fermenten vorhanden, womit ein älterer Befund von Achalme[2]) über den Fermentgehalt des Eiters in Einklang steht.

Dasselbe gilt auch für die Hefezelle. Ich entnehme der Literatur — ohne irgendwelchen Anspruch auf Vollständigkeit —

---

[1]) Die chemische Organisation der Zelle. Braunschweig 1901.
[2]) Compt. rend. soc. biol. 51, 568.

folgende Daten. In einer jeden Zweifel ausschließenden Weise sind aufgefunden: Invertase (Berthelot 1860[1]), eine Maltase (Bourquelot 1886, E. Fischer 1897[2]), Zymase (Buchner 1897[3]), Endotryptase (ein proteolytisches Ferment, Geret und Hahn 1898[3]), Oxydasen (Grüß 1901[4]), ein labendes Enzym (Rapp 1902[5]) und Katalase (Buchner 1903[3]). Wahrscheinlich gemacht ist die Existenz einer Trehalase (E. Fischer 1898[2]), eines Glykogen hydrolysierenden (Buchner 1903[3]) und endlich eines reduzierenden Fermentes (Hahn 1903[3]), das vielleicht mit Zymase identisch ist. Diese sämtlichen Angaben beziehen sich ausnahmslos auf die gewöhnliche untergärige Bierhefe, und es ist von der Anführung der speziellen Enzyme physiologischer Rassen, die mit besonderen Fähigkeiten ausgestattet sind, mit Absicht abgesehen worden, da es darauf ankam, zu zeigen, wie zahlreiche Fermente nebeneinander in einer Zelle vorkommen. Für Milchzuckerhefe mit Laktase (Fischer 1897[2]), um nur dies eine Beispiel zu nennen, wäre aber wieder die Gegenwart eines oder des anderen der angegebenen Enzyme fraglich gewesen.

Es ist somit für einzelne Zellkategorien sowohl tierischer als pflanzlicher Natur das Nebeneinander einer größeren Anzahl von Enzymen erwiesen, und die Annahme, daß dies nur der Ausdruck einer allgemeinen Erscheinung ist, erscheint mir, wie schon oben angeführt, durchaus berechtigt. Immerhin schien es erwünscht, die Zahl der Beispiele zu vermehren, und zwar bot das Studium des Fruchtkörpers von Fuligo varians um deswillen noch ein ganz besonderes Interesse, weil dieser in den von mir untersuchten Entwickelungsstadien im wesentlichen nur aus protoplasmatischer Substanz besteht. Auch erfüllt dieses Objekt ebenso wie die erwähnten — Leberzellen, Hefe — die für eine derartige makrochemische Untersuchung unerläßliche Voraussetzung, daß die Zellen oder Einzelbestandteile, so weit unsere optischen Hilfsmittel eine Unterscheidung zulassen, durchaus gleichartig erscheinen. Anderenfalls müßte die Annahme, die gefundenen Fermente seien tatsächlich nebeneinander in sämtlichen Zellen vorhanden, von vorn-

---

[1]) Zitiert nach Green-Windisch, Die Enzyme. 1901, S. 109.

[2]) Emil Fischer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 26, 72 (1898/99) und die dort zitierte Literatur.

[3]) Die Veröffentlichungen von Buchner, Hahn und ihren Mitarbeitern sind zusammengestellt in Buchner u. Hahn: Zymase-Gärung. München 1903.

[4]) Grüß, Wochenschr. f. Brauerei 18 (1901), zitiert nach einem Referat im Centralblatt für Bakteriologie, II. Abt. 9, 448.

[5]) Rapp, Centralblatt f. Bakt. usw., II. Abt. 9, 625.

herein im Hinblick auf spezielle Ausgestaltungen bedenklich erscheinen [1]).

Material. Zu meinen Versuchen benutzte ich ausnahmslos die zur Bildung von Fruchtkörpern sich anschickenden Plasmodien, die nach schwülen, feuchten Sommernächten in den ersten Morgenstunden auf alter Lohe zu finden sind. Es sind dies ganz licht schwefelgelbe Fladen von äußerst weicher, rahmiger Konsistenz. Ihre Farbe geht an der Luft, besonders an den beim Abnehmen verletzten Stellen, sehr rasch in ein dunkles Braungelb über, was auf Oxydationsvorgänge hinzudeuten scheint. Die in den Studien von Reinke und Rodewald [2]) untersuchten Plasmodien dürften sich ungefähr auf demselben Entwickelungsstadium befunden haben.

Da es mir — bei der ausnehmend geringen Haltbarkeit des Materials — nicht möglich war, dasselbe nur in frischem Zustande zu verarbeiten, konservierte ich die Fruchtkörper in der Weise, daß ich sie unmittelbar an ihrem Standorte in gesättigtes Toluolwasser einlegte. Sie hielten sich in diesem lange Zeit (über ein halbes Jahr) im kühlen Raum (Keller) anscheinend völlig unverändert, bewahrten die helle Farbe, weiche Konsistenz und ihren charakteristischen Geruch; auch waren keinerlei Symptome von Fäulnis wahrnehmbar. Trotzdem legte ich Wert darauf, in jeder Reihe wenigstens einen bestätigenden Versuch mit frischem Material anzustellen.

1. Ein Labenzym.

Die Literatur ergibt eine weite Verbreitung labender Enzyme im Tier- und Pflanzenreich [3]), auch bei niederen Formen [4]). Dagegen konnten Reinke und Rodewald dasselbe bei Fuligo nicht nachweisen, wie folgende kurze Notiz ergibt:

„Die im Glycerinextrakt enthaltene Substanz wurde mit Alkohol ausgefällt; der mit Wasser angerührte Niederschlag ver-

---

[1]) Vgl. hierüber Hofmeister, l. c. S. 10.

[2]) Untersuchungen aus dem botanischen Laboratorium zu Göttingen. Heft II, S. 7 u. 8.

[3]) Vgl. die Zusammenstellungen bei: Green-Windisch, Enzyme, S. 246 ff.; Oppenheimer, Fermente, S. 186; ferner Neumeister, Physiol. Chemie, S. 139; Czapek, Biochemie der Pflanzen 2, 86 u. 168; Fuld, Ergebnisse der Physiologie 1, 468; Pfeffer, Physiologie 1, 368 u. 512.

[4]) Speziell: Bakterien: Flügge, Mikroorganismen (3. Aufl.) 1, 209; Lafar, Technische Mykologie (1. Aufl.) 1, 215; Czapek, l. c. 2, 86. — Hefe: Rapp, Centralblatt für Bakteriolog. usw., II. Abteilg., 9, 625. — Pilze: Bruhne, Zopfs Beiträge, Heft IV, S. 27; Sarto, Bot. Mag. Tokyo, Vol. XVII, Nr. 201 (zitiert nach Czapek). — Niedere Tiere: Fürth, Vergl. chem. Physiolog. der nied. Tiere, S. 155 u. 163; Kobert, Pflügers Archiv 99, 468.

mochte frische Milch auch bei längerem Stehenlassen und gelinder Erwärmung nicht zu koagulieren: Abwesenheit eines Labfermentes[1])."

Bei meinen eigenen Versuchen wurde — wie auch bei den folgenden über andere Fermente — das Plasmodium im Porzellanmörser unter Zusatz von feinem Sand wiederholt verrieben und 12, zuweilen 36 Stunden extrahiert, alsdann klar filtriert und möglichst genau neutralisiert[2]). Letzteres bot wegen des reichlichen Gehaltes an kohlensaurem Kalk[3]) eine gewisse Schwierigkeit. Die Milch kam stets nur frisch (ungekocht) zur Verwendung und wurde zu Beginn sowie am Ende des Versuches, also nach dem Gerinnen, auf amphotere Reaktion geprüft. Als Zeitpunkt des Gerinnens galt erst das völlige oder doch nahezu völlige Erstarren der ganzen Masse (Milch + Extrakt). Die Kontrolle war eine doppelte, indem das Verhalten der Milch mit der gleichen Gabe aufgekochten Extraktes und ebenso mit derselben Menge Wasser beobachtet wurde. Nur im ersten Versuche wurde die letztere Kontrollprobe noch nicht ausgeführt.

Versuch 1. Extraktion mit Chloroformwasser. Tmp. Brutofen. Gabe: 10 ccm Milch, 2 ccm Extrakt. Weder mit frischem, noch mit aufgekochtem Extrakt in 65 Minuten Gerinnung.

Versuch 2. Extraktion mit 0,3 Proz. Salzsäure. Tmp. Brutofen. a) Gabe: 2 ccm Extrakt auf 10 ccm Milch. Geronnen in 45 Minuten. Die Kontrollproben nach 55 Minuten noch flüssig; nach 5 Stunden geronnen. b) Gabe: 4 ccm Extrakt auf 10 ccm Milch. Geronnen in 20 Minuten; Kontrollproben nach 40 Minuten noch flüssig, nach 6 Stunden fest.

Versuch 3. Tmp. Brutofen. a) Extraktion mit verdünnter Säure. 2 ccm Extrakt auf 10 ccm Milch. Geronnen in 80 Minuten. Kontrollproben nach 5 Stunden flüssig. b) Extraktion mit Chloroformwasser. 2 ccm Extrakt auf 10 ccm Milch. Nach 5 Stunden noch unverändert; ebenso die Kontrollproben.

Versuch 4. Extraktion mit verdünnter Schwefelsäure. Tmp. etwa 25° C. 5 ccm Extrakt bringen 10 ccm Milch in 45 bis 60 Minuten zur Gerinnung.

Versuch 5. Tmp. 35° C. a) Extraktion mit verdünnter Schwefelsäure. 2 ccm Extrakt bringen 6 ccm Milch in 60 Minuten zum Gerinnen. 2 ccm Wasser und 6 ccm Milch nach 24 Stunden dick und sauer. 2 ccm gekochtes Extrakt mit 6 ccm Milch nach 24 Stunden noch flüssig. b) Extraktion mit Chloroformwasser. 2 ccm Extrakt auf 6 ccm Milch. Gerinnung in 2 bis $2^1/_2$ Stunden. Kontrollproben wie bei A.

---

[1]) l. c. S. 52.

[2]) Das Plasmodium reagierte stets alkalisch.

[3]) Vgl. Krukenberg, Untersuchungen aus dem physiologischen Institut der Universität Heidelberg 2, 273 (1878).

Versuch 6. Zimmertemperatur. Säure-Extrakt; nach 2 Stunden flüssig, nach $3^1/_2$ Stunden geronnen. Chloroformwasser-Extrakt; nach 6 Stunden unverändert, nach 24 Stunden fest. Die Kontrollproben mit gekochtem Extrakt nach 48 Stunden noch flüssig.

Alle diese Versuche waren mit konserviertem Material angestellt, aber auch frisches ergab das gleiche Resultat.

Versuch 7. Der Pilz wurde um 10^{45} V. abgeerntet und in einer Stöpselflasche zum Laboratorium gebracht. Gegen 12 Uhr wurde die Extraktion mit verdünnter Säure angestellt und am folgenden Vormittag um 10 Uhr geprüft. Das Filtrat reagierte wieder schwach alkalisch. a) 2 ccm dieses Filtrates brachten bei 30° 2 ccm Milch in 16 bis 21 Minuten zur Gerinnung. Die Kontrollproben mit aufgekochtem Filtrat waren nach $5^1/_2$ Stunden noch unverändert. b) Wurde das Filtrat genau neutralisiert, so trat, allerdings bei etwas höherer Temperatur, die Gerinnung schon nach 12 Minuten ein. Die Kontrollproben nach $4^1/_2$ Stunden unverändert.

Es ergibt sich also aus den angeführten Versuchen das Vorhandensein eines labenden Enzymes bei Fuligo. Dasselbe ist verhältnismäßig leicht mit verdünnter Säure extrahierbar, während die Chloroformwasser-Auszüge, wenn überhaupt, nur eine wesentlich schwächere Wirksamkeit zeigten, wobei zu beachten ist, daß infolge der Reaktion des Plasmas in letzterem Falle in alkalischer Lösung digeriert wurde. Damit dürften auch die abweichenden Befunde von Reinke und Rodewald eine befriedigende Erklärung finden [1].

Zur Aufhellung der Frage, welche der drei möglichen Deutungen für diesen Unterschied — Schädigung des Fermentes durch Chloroform oder Gegenwart eines durch Säure aktivierbaren Profermentes [2] oder endlich Unlöslichkeit des Enzymes in neutralem Medium — zutreffe, wurden folgende Versuche angestellt:

Erstens wurde sowohl bei Gegenwart von Chloroform als auch ohne dasselbe mit verdünnter Säure extrahiert. In beiden Fällen waren die Filtrate wirksam [3], was gegen die Annahme einer Schädigung durch den Chloroformzusatz spricht. Dagegen gelang es nicht, das filtrierte alkalische Extrakt durch längeres oder kürzeres Ansäuern derart zu aktivieren, daß es nach erfolgter Neutralisation Wirksamkeit gezeigt hätte. Ein lösliches, durch Säure

[1]) Daß es sich bei den genannten Autoren nicht um eine Schädigung des Enzymes durch die Alkoholfällung handelt, zeigen die Versuche 9 u. 10.

[2]) Wie in der Magenschleimhaut der Säugetiere nach Hammarsten, Malys Jahresbericht 2, 118 (1872); Zitat nach Glaeßner: Diese Beiträge 1, 1.

[3]) Gerinnungszeiten (2 ccm Milch und 2 ccm Extrakt) $1^1/_4$ bis $1^3/_4$ Stunden; die Kontrollproben nach 5 Stunden unverändert.

aktivierbares Proferment schien also nicht vorhanden. Kurzes Aufkochen endlich bei alkalischer Reaktion mit darauf folgender Säureextraktion führte auch nicht zum Ziele. Es konnte somit die Frage nach einem eventuellen Proferment nicht definitiv entschieden werden.

Auch das Zeitgesetz der Labung[1]) (Labmenge × Gerinnungszeit = Konstanz) hat für das gefundene Ferment Gültigkeit, wie der folgende Versuch (8) zeigt, dessen Resultate sich am übersichtlichsten in Tabellenform wiedergeben lassen:

Tabelle I.

Extraktion mit verdünnter Schwefelsäure[2]). Tmp. 35° C.

Nr.	Gaben in ccm			Gerinnungszeit		Gabe × Gerinnungszeit	Verlangte Gerinnungszeit	Fehler in Proz.
	Milch	Extrakt	Wasser	in Min.	im Mittel			
10	5	5	0	18	18	90	18,4	0[3])
9	5	5	0	18				
8	5	4	1	22	23	92	23[4])	0
7	5	4	1	24				
6	5	3	2	29	29,5	88,5	30,7	4
5	5	3	2	30				
4	5	2	3	48	48	96	46	4
3	5	2	3	48				
2	5	1	4	220	220	220	92	—
1	5	1	4	220				
Kontrollprobe:	5	0	5	Nach 7 Stunden noch flüssig.				

Da die Versuche ohne besondere Kautelen[5]) angestellt wurden, kann die Übereinstimmung als eine sehr gute bezeichnet werden, mit Ausnahme der stärksten Verdünnung (Nr. 1 und 2). Diese Abweichung von dem genannten Gesetz bei sehr schwach wirkenden Lösungen ist übrigens häufiger beobachtet, möglicherweise durch eine Schädigung des Enzymes durch verdauende Fermente oder dergleichen bedingt.

---

[1]) Siehe Fuld in diesen Beiträgen 2, 169 (1902), wo auch die einschlägige Literatur zusammengestellt ist.

[2]) Wurde der Salzsäure vorgezogen, da durch diese bei dem großen Gehalt an kohlensaurem Kalk bedeutende Mengen Chlorcalcium in die Lösung gekommen wären.

[3]) Da Bruchteile von Minuten nicht abgelesen wurden.

[4]) Dieser Wert wurde als Mittel genommen.

[5]) Über diese Näheres in der zitierten Arbeit von Fuld.

Des weiteren gelang es auch, das Ferment noch etwas reiner zu erhalten durch Ausfällen mit dem gleichen Volum absoluten Alkohols und Aufschlämmen des Rückstandes mit Wasser.

Versuch 9. Es wurde, wie üblich, mit verdünnter Schwefelsäure extrahiert; 120 ccm des ganz schwach opaleszierenden Filtrates wurden mit der gleichen Menge absoluten Alkohols gefällt und sofort filtriert. Von dem Niederschlag wurden etwa zwei Drittel in 30 ccm Wasser aufgeschlämmt, worin, da Auswaschen unmöglich war und völliges Trocknen wegen Schwierigkeit bei der Wiederauflösung vermieden wurde, natürlich noch Spuren von Alkohol enthalten waren. 4 ccm dieser Aufschlämmung brachten 10 ccm Milch (bei 30° C) in 3 Stunden 23 Minuten zum Gerinnen. Der Rest (etwa ein Drittel des Niederschlags) wurde direkt mit 10 ccm Milch angerührt, wobei nach $^3/_4$ Stunden [1]) die Masse geronnen war.

Versuch 10. Tmp. 40° C. Extraktion durch 12 Stunden mit verdünnter Schwefelsäure. 90 ccm des fast klaren Filtrates mit 90 ccm Alkohol gefällt und sofort abgesaugt. Etwa die Hälfte des Rückstandes mit 20 ccm Wasser angerührt und davon: 1. 4 ccm mit 10 ccm Milch angesetzt: Gerinnung in 42 Minuten. (Kontrollprobe mit gekochtem Extrakt nach 80 Minuten unverändert und selbst nach 48 Stunden, abgesehen von einem Rahmpfropf an der Oberfläche, noch flüssig.) 2. 4 ccm mit 5 ccm Milch und 1 ccm Wasser: Gerinnung in 30 Minuten. (Kontrolle wie oben bei 1.) Als weitere Kontrollproben wurden noch angesetzt: 3. 2 ccm des klaren Filtrates vor der Alkoholfällung mit 5 ccm Milch: Gerinnung in 38 Minuten, und 4. 5 ccm Milch mit 2 ccm Wasser: nach 123 Minuten unverändert, nach 48 Stunden fest und sauer.

Auch bei diesem Versuche dokumentierte sich, wie der Vergleich von 1 und 2 ergibt, das Zeitgesetz der Labung; denn bei 1 enthielten 10 ccm des Gemisches 2,83 ccm Aufschlämmung, das ergibt multipliziert mit der Gerinnungszeit 118,86, und bei 2 — in 10 ccm 3,3 ccm Aufschlämmung mal 35 (Gerinnungszeit) — 116,75; Fehler etwa 2 Proz.

Es gelang also das Ausfällen und Wiederauflösen des Enzymes, allerdings unter ziemlicher Abschwächung der Wirksamkeit, nämlich auf ein Drittel des ursprüngliches Wertes [2]).

Da bei einzelnen Versuchen (5 und 10) die Gerinnung bei Zusatz von aufgekochtem Extrakt selbst nach 24 bzw. 48 Stunden nicht eintrat, während Milch mit Zusatz von reinem Wasser nach derselben Zeit jedesmal fest war, kam ich zur Vermutung, es könne ein kurzes Aufkochen vertragendes Antilab im Extrakt vorhanden sein. Zur Prüfung dieser Annahme diente der folgende Versuch:

---

[1]) Wohl schon eher, doch wurde nicht früher nachgesehen.

[2]) Die entsprechenden Zahlen (Enzymmenge × Gerinnungszeit) sind 3,8 für das unbehandelte Filtrat und 9 für die Alkoholfällungen, unter entsprechender Berücksichtigung der Konzentrationsänderungen.

Tabelle II.

Versuch 11. Tmp. 40° C.

Nr.	Milch ccm	Frisches Extrakt ccm	Aufgekochtes Extrakt ccm	Wasser ccm	Gerinnungszeit Min.	Saftkonzentration × Gerinnungszeit
1	10	4	—	4	57	228
2	10	4	—	4	57	228
3	10	4	4	—	28	112
4	10	4	4	—	28	112
5	10	—	8	—	nach 6 Stnd. flüssig; nach 24 Stnd. einige Flocken, aber noch flüssig.	
6	10	—	8*)	—	—	—
7	10	—	—	8	nach 7 Stnd. flüssig,	
8	10	—	—	8	„ 24 „ dick und sauer.	
9	10	4	—	4	50	200
10	10	4	4	—	39	156
11	10	8	—	—	22	176
12	10	8	—	—	21	168

*) Zu Nr. 6 nach 4 Stnd. 4 ccm frisches Extrakt, Gerinnung alsdann in 90 Minuten.

Es trat also beim Zufügen des aufgekochten Extraktes nicht nur keine Verzögerung, sondern im Gegenteil eine beträchtliche Beschleunigung des Gerinnungsvorganges ein. Doch ist dieselbe derart, daß sie mit der Wirkung vorhandener Salze, speziell Chlorcalcium, erklärt werden mag.

Tabelle III.

Versuch 12. Extraktion mit verdünnter Schwefelsäure. Tmp. 35° C.

Nr.	Milch ccm	Frisches Extrakt ccm	Aufgekochtes Extrakt ccm	Wasser ccm	½ proz. $CaCl_2$-Lösung ccm	Gerinnungszeit Min.	Gabe × Gerinnungszeit	Mittel
1	10	2	6	—	—	110	220	225
2	10	4	4	—	—	54	216	
3	10	6	2	—	—	40	240	
4	10	—	8	—	—	Noch flüssig nach 7 Stunden.		
5	10	2	—	6	—	290	(580)	
6	10	4	—	4	—	85	340	304 (ohne Nr. 5.)
7	10	6	—	2	—	46	276	
8	10	8	—	—	—	37	296	
9	10	2	—	—	6	78	156	183
10	10	4	—	—	4	41	164	
11	10	6	—	—	2	38	228	
12	10	—	—	—	8	365	—	
13	10	—	—	8	—	Noch flüssig nach 7 Stunden.		

Der Versuch macht nicht den Anspruch, streng quantitativ zu sein; immerhin ergibt er mit großer Schärfe, daß die Beschleunigung der Gerinnung durch aufgekochtes Extrakt mit der Wirkung darin vorhandener Salze erklärt werden kann. Dagegen dürfte die zuerst beobachtete Hemmung der Gerinnung beim Zufügen von nur aufgekochtem Extrakt mit der Verzögerung des Sauerwerdens durch den eingebrachten kohlensauren Kalk erklärbar sein. Doch lag es außerhalb des Rahmens meiner Untersuchung, weiter auf diese, wie die vorhandenen Literaturangaben lehren, ungemein komplizierten Verhältnisse des Labungsvorganges einzugehen.

2. Proteolytische Enzyme.

War ich beim Lab genötigt, meine Versuche ausführlich mitzuteilen, da lediglich eine, und zwar negative Prüfung in der Literatur vorlag, so kann ich mich jetzt um so kürzer fassen. Schon 1878 hatte Krukenberg[1]) aus der Lohblüte ein proteolytisches, nur in saurer Lösung wirksames Enzym, das er darum Pepsin nannte, dargestellt. Es konnte mit Glycerin oder verdünnter Säure extrahiert werden und wirkte sowohl auf rohes als auf gekochtes Fibrin; ließ sich auch mit Alkohol fällen und danach in verdünnter Säure wieder auflösen. Reinke und Rodewald[2]) bestätigen diesen Befund bei gleichem Extraktionsverfahren, aber mit gekochtem Hühnereiweiß als Reagens auf die Verdauungswirkung. Endlich haben neuerdings Fermi und Buscaglioni[3]) neben einer größeren Anzahl von Pflanzengeweben, Extrakten und Säften auch Fuligo auf die Fähigkeit, Karbolgelatine zu verflüssigen, untersucht und positive Resultate erhalten.

Meine eigenen Versuche wurden mit Karbolgelatine nach Fermi[4]) angestellt und ergaben eine deutliche Lösung der angesäuerten Gelatine, aber auch nur dieser, während mit Soda alkalisch gemachte nicht angegriffen wurde. Ebenso waren die Kontrollproben mit den aufgekochten Extrakten in allen Fällen unwirksam. Es ergab sich also in jeder Hinsicht eine Bestätigung der vorhandenen Angaben.

Doch war im ganzen die verflüssigende Kraft, wenigtens bei Zimmertemperatur, ziemlich gering und schien auch beim Aufbewahren rasch abzunehmen; denn ich erhielt die mitgeteilten

---

[1]) Unters. aus dem physiol. Institut der Universität Heidelberg 2, 273.
[2]) l. c. Heft II, S. 52 (1881).
[3]) Centralblatt f. Bakteriologie usw., II. Abt., 5, 24 (1899).
[4]) S. Fermi, Centralblatt f. Bakteriologie usw., II. Abt., 16, 176.

Resultate nur mit ganz frischem Material und am besten mit der Flüssigkeit, in die die Plasmodien am Fundort eingebracht wurden. Das aus diesen genommene und dann erst zerriebene Material gab schon ein weit weniger wirksames Extrakt. Möglicherweise ist gerade diese geringe Beständigkeit der proteolytischen Enzyme der Grund für die Haltbarkeit der anderen.

Das hier Mitgeteilte wäre unvollständig ohne die Erwähnung einer Arbeit von Čelakovský jr.[1]). Derselbe hat keine makrochemischen Versuche über das Vorhandensein von eiweißlösenden Enzymen angestellt, sondern beobachtete nach einer von Pfeffer eingeführten Methode [2]) direkt unter dem Mikroskop die Verdauung eingebrachter Eiweißpartikel im Plasmodium bzw. in Vacuolen desselben. Da er nun bei Abwesenheit von Bakterien eine Lösung in den Vacuolen, und zwar nur in diesen, beobachtete, beweisen auch seine Versuche die Gegenwart von proteolytischem Enzym. Doch erweitern Čelakovskýs Resultate die obigen Befunde, da er feststellen konnte, daß die Lösung des Eiweißes mit der gleichen Intensität vor sich geht, einerlei, ob der Vacuolensaft gegen Lakmus sauer, neutral oder alkalisch reagiert. Wenn auch die neuere Forschung die Unterscheidung zwischen peptischem und tryptischem Ferment nicht sowohl darin sucht, ob die Wirksamkeit durch saure oder alkalische Reaktion des Mediums ermöglicht wird, sondern in der Art und Weise des Eiweißzerfalles, also den entstehenden Abbauprodukten findet [3]), so bleibt doch zwischen den Befunden Čelakovskýs am lebenden Myxomyceten und den Ergebnissen der makrochemischen Untersuchungen an totem Material ein gewisser Widerspruch. Denn auch Krukenberg [4]) teilt mit, daß sein Glycerinextrakt nur in saurer Lösung, nicht aber in reinem Wasser oder Sodalösung wirksam war; er berichtet ferner, daß Kühne gleichfalls vergebens nach tryptischem, d. h. also nach der damaligen Nomenklatur nach bei alkalischer Reaktion verdauendem Enzym gesucht habe. Fermi und Buscaglioni lassen darum die Frage, ob peptisches oder tryptisches Ferment vorliege, offen und deuten vermutungsweise als Möglichkeit an, daß die Enzyme unter dem Einflusse des lebenden Organismus weniger

[1]) Flora 76, 182 (1892).

[2]) „Aufnahme und Ausgabe ungelöster Körper“ und „Zur Kenntnis der Plasmahaut und Vacuolen usw.“. Abhandlungen der mathemat.-physischen Klasse der Königl. sächs. Gesellschaft der Wissenschaften 16, Nr. II (1890).

[3]) Z. B.: Fermi und Buscaglioni, l. c. p. 156. — Geret u. Hahn in Buchner u. Hahn, Zymasegärung, S. 320 ff.

[4]) l. c. S. 273, 274.

empfindlich seien, als wenn isoliert. Ohne dies von der Hand zu weisen, möchte ich auf einen weiteren Punkt aufmerksam machen, der in der gedachten Hinsicht jedenfalls Berücksichtigung verdient. Wie Čelakovský[1]) angibt, läßt die verdauende Kraft der Plasmodien in den Entwicklungszuständen, die der Fruchtbildung unmittelbar vorangehen, sehr stark nach, sofern sie nicht völlig erlischt. Aber gerade die Plasmodien, die sich zur Sporenbildung anschicken, sind es, die auf die Oberfläche des Substrates (der Lohe) heraufkriechen und darum wohl vornehmlich, wenn nicht ausschließlich, bei den makrochemischen Untersuchungen Verwendung fanden. Es scheint mir somit die Annahme ziemlich wahrscheinlich, daß außer dem in saurer Lösung arbeitenden, proteolytischen Ferment auch ein in neutraler oder alkalischer Lösung tätiges in jüngeren Entwicklungsstadien vorhanden ist.

Die bei meinen Versuchen beobachtete nur sehr schwache Wirksamkeit auch des in saurer Lösung verdauenden Enzyms scheint mir gleichfalls, im Hinblick auf das eben Gesagte, durch die angeführte Beobachtung Čelakovskýs, erklärbar zu sein.

Übrigens hoffe ich, im Laufe des nächsten Sommers auf die Frage nach einer eventuellen zeitlichen Aufeinanderfolge im Auftreten verschiedener Enzyme während der Entwicklung von Fuligo, die auch auf die Stoffwechselphysiologie Ausblicke zu eröffnen geeignet sein dürfte, zurückkommen zu können.

3. Katalase.

Schon von Schönbein[2]) wurde beobachtet, daß frisches Blut, sowie eine größere Anzahl von Säften oder Extrakten aus Tier- und Pflanzenkörpern die Fähigkeit besitzen, Wasserstoffsuperoxyd unter Sauerstoffentwicklung zu zerlegen. Später schrieb Loew[3]) einem mit diesem Vermögen ausgestatteten Enzym, das er als Urtyp von allen „Katalase“ nannte, eine ganz allgemeine Verbreitung zu. Dasselbe ist im Extrakte der Lohblüte unschwer festzustellen, wie folgende Versuche zeigen.

Das Material wurde wie üblich zerkleinert und mit Chloroformwasser extrahiert, alsdann klar filtriert und genau neutralisiert. Davon wurde je 1 ccm mit 1 ccm Wasser versetzt, das zwei Tropfen einer 30 proz. Lösung von Perhydrol (Merk) enthielt. Es trat darauf in sämtlichen Proben mit

---

[1]) l. c. S. 230.

[2]) Journ. für prakt. Chemie **89**, 334 (1863).

[3]) Catalase, a new enzym of general occurence. U. S. Department of agriculture. Report No. 68 (1901).

frischem Filtrat innerhalb weniger Minuten eine lebhafte Gasentwicklung ein, die rasch zur Bildung einer Schaumdecke führte. Dagegen löste das aufgekochte und zur Entfernung des dabei gebildeten Niederschlages nochmals filtrierte Extrakt zunächst keine Reaktion aus, und erst nach Ablauf von 5 Stunden war eine ganz schwache Gasentbindung zu bemerken.

Genau wie der oben mitgeteilte verliefen zwei weitere Versuche bei Zimmertemperatur. Auch bei 30° C zeigte das frische Extrakt schon eine Minute nach dem Zusatz des Wasserstoffsuperoxyds eine sehr lebhafte Gasentwicklung, während das aufgekochte, wenn überhaupt eine, nur eine ganz minimale hervorrief. Der Unterschied wurde im weiteren Ablauf der Versuche immer ausgesprochener und war selbst nach zwei Tagen noch deutlich zu erkennen. Nach drei Tagen fand in keiner der Proben mehr Gasentwicklung statt.

Wurde der alkalisch reagierende Saft vor dem Wasserstoffsuperoxydzusatz nicht neutralisiert, so war der Unterschied im Verhalten der Proben mit frischem und aufgekochtem Extrakt weniger scharf. In einem ersten Versuch konnte überhaupt nicht mit Bestimmtheit von einem solchen gesprochen werden. In einem zweiten war allerdings eine deutliche Differenz vorhanden, die nach 15 Minuten besonders ausgeprägt war, aber im Gegensatz zu den zuerst mitgeteilten Versuchen fand auch in der aufgekochten Probe Gasentwicklung statt und bildete sich eine Schaumdecke, die allerdings dauernd schwächer blieb als in den Proben mit frischem Extrakt.

Glycerinextrakte (offizinelles Glycerin, spez. Gew. 1,230, mit dem gleichen Volum Wasser verdünnt) bestätigten diese Resultate; denn während sie, falls frisch benutzt, sofort heftige Gasentbindung auslösten, zeigten sie nach dem Aufkochen selbst nach einer Stunde keinerlei Wirkung.

Endlich ergaben auch Versuche mit ganz frisch geerntetem Material — um 11 Uhr gesammelt, von 12 bis 4 Uhr mit Wasser extrahiert, dann filtriert und sofort geprüft — das gleiche Resultat. In einem Falle, in dem die Lösung nach dem Superoxydzusatz sauer reagierte [1]), zeigte das aufgekochte Extrakt, auch ohne daß nach dem Aufkochen nochmals filtriert wurde, keine Spur einer Reaktion, das nicht gekochte dagegen eine sehr heftige. In einem zweiten Versuche wurde neutralisiert, und während auch dabei die aufgekochten Proben wirkungslos waren, zeigte sich bei den frischen Schaumdecken (im Reagenzglas), die nach 5 Minuten im Durchschnitt 18 mm, nach 10 Minuten etwa 25 mm hoch waren. Es fand mithin auch hier eine ungemein energische Zersetzung statt.

4. Oxydationsfermente.

a) Tyrosinase.

Ich stelle die Tyrosinase [2]), der üblichen Einteilung folgend, zu den Oxydationsfermenten, obwohl Gonnermann sie neuerdings

---

[1]) Infolge der sauren Reaktion der Wasserstoffsuperoxydlösung, die bei diesen Versuchen nicht von Merk bezogen war.

[2]) Über die Verbreitung der Tyrosinase: Fürth u. Schneider in Hofmeisters Beiträgen 1, 229. (Für Pflanzen auch: Czapek, Jahrbücher für wissensch. Botanik 43, 368. Nachträglicher Zusatz.)

den hydrolysierenden zurechnet [1]), ohne damit in dem einen oder anderen Sinne Stellung nehmen zu wollen, und zwar vornehmlich aus einem mehr äußeren Grunde, weil nämlich die Löslichkeitsverhältnisse des Tyrosinlösung färbenden und des Guajaconsäure bläuenden Fermentes eine weitgehende Übereinstimmung zeigten.

Als Reaktion auf Tyrosinase diente das Auftreten einer dunklen, zuletzt nahezu schwarzen Färbung beim Versetzen des Extraktes mit einer kalt gesättigten Tyrosinlösung. Auch hier war eine doppelte Kontrolle erforderlich, da sowohl das Nachdunkeln des mit destilliertem Wasser angerührten Extraktes als auch das Verhalten der aufgekochten Masse mit Tyrosinlösung beobachtet werden mußte.

Zunächst erwies sich das vollkommen klare Filtrat, abgesehen von dem schwachen Nachdunkeln, das auch ohne Tyrosinzusatz eintrat, in allen Fällen als gänzlich unwirksam, gleichgültig, ob die Extraktion mit Chloroformwasser, verdünnter Säure, Glycerin oder Eiweiß vorgenommen wurde. Dagegen trat mit dem unfiltrierten Extraktionsgemisch stets eine ausgesprochene Reaktion ein, die jedoch im alkalisch reagierenden Chloroformwasser stärker war als bei der Behandlung mit verdünnter Säure.

Anhaltspunkte über den Sitz dieses bis jetzt nicht in Lösung zu bringenden Enzyms liefern die folgenden Daten. Das zerriebene Material wurde mit Chloroformwasser übergossen und 12 bis 36 Stunden sich selber überlassen. Es bildeten sich dann jeweils folgende drei Schichten:

1. An der Oberfläche hing eine größere oder geringere Anzahl ziemlich grober Partikel.
2. Darunter folgte eine Zone, die durch Suspension kleiner Teilchen homogen getrübt erschien.
3. Die Hauptmasse des zerkleinerten Materials sank als schwerer Brei zu Boden.

Alle drei Schichten schwärzten Tyrosinlösung. Rein von den beiden anderen konnte jedoch nur die mittlere durch Pipettieren gewonnen werden, wogegen die beiden anderen immer von den feinen Teilchen der Mittelschicht durchsetzt blieben. Die abgetrennte Mittelschicht war wirksam, nicht aber ihr klares Filtrat; wohl aber, wenn auch sehr abgeschwächt, die zuerst das Filter passierenden Portionen mit schwacher Trübung. Versuche, durch Zentrifugieren eine Anreicherung der wirksamen Teile herbeizuführen, blieben

[1]) Z. B.: Centralblatt für die Zuckerindustrie, XIV. Jahrg., Nr. 29.

erfolglos, wenigstens mit der mir zur Verfügung stehenden kleinen Handzentrifuge. Ich versetzte nunmehr, um das spezifische Gewicht der Flüssigkeit herabzusetzen, mit dem gleichen Volum absoluten Alkohols und erzielte dadurch beim Zentrifugieren reichlichen Bodensatz, und die überstehende Flüssigkeit war nur unbedeutend getrübt. Der Bodensatz wirkte sehr energisch auf Tyrosinlösung. Allerdings erzeugt die angewandte Dosis Alkohol auch in dem klaren Filtrat einen ansehnlichen Niederschlag, der bei der angeführten Behandlung zusammen mit den vorher vorhandenen Suspensionen im Bodensatz erscheint. Doch kann diese Alkoholfällung die aktive Substanz unmöglich enthalten, da das klare Filtrat vor der Alkoholbehandlung unwirksam ist.

Das Resultat meiner zahlreichen Versuche, deren genauere Wiedergabe unnötig erscheint, ist also der Nachweis eines Tyrosin schwärzenden Enzyms (einer Tyrosinase), das jedoch von den suspendierten festen Teilchen nicht getrennt werden konnte. Möglicherweise gelingt die Trennung noch beim Auffinden eines geeigneten Lösungsmittels. Andererseits wäre auch denkbar, daß die Löslichkeit, sei es des Fermentes, sei es des Tyrosins, in Wasser zu gering ist, um genügende aktive Massen (hinreichende Konzentrationen) für das Zustandekommen der Reaktion miteinander in Berührung zu bringen.

Endlich wären auch feste Enzyme, d. h. unlösliche Stoffe, die nur an der Oberfläche, nach Art des Platinschwarz, ihre spezifische Wirksamkeit entfalten, vorstellbar, ein Gedanke, der im Hinblick auf die räumlichen Sonderungen, die wir für viele der chemischen Umsetzungen im Organismus bzw. in der Zelle anzunehmen gezwungen sind, besonders sympathisch erscheint.

b) Die Guajaconsäurereaktion.

Es wurde nach der Vorschrift von Liebermann[1]) verfahren, nur wurde an Stelle des Guajakharzes die reine Guajaconsäure (bezogen von Merck) benutzt, deren alkoholische Lösung jedesmal frisch bereitet wurde.

Auch hier ergab eine Reihe von Versuchen eine unzweifelhafte Reaktion nur mit den festen Teilen des zerkleinerten Plasmodiums, nicht aber mit den klar filtrierten Auszügen, und auch in der Aufschlämmung schien die Färbung immer von den festen Partikeln auszugehen. In dieser Hinsicht stimmt also das

---

[1]) Pflügers Archiv für Physiologie **104**, 209.

Verhalten des auf Guajaconsäure wirkenden Agens mit dem der vorbesprochenen Tyrosinase überein, dagegen erschien dasselbe — wenigstens in Toluolwasser — weniger haltbar als letztere, denn die Guajaconsäurereaktion mit dem konservierten Material war zum mindesten unsicher[1]), während die Tyrosinschwärzung mit frischem, wie mit konserviertem Material etwa gleich rasch verlief.

Die Blaufärbung trat schon ohne den Zusatz von altem Terpentinöl oder Wasserstoffsuperoxyd ein, wurde aber durch letzteres ungemein verstärkt. Es scheinen also nach der Nomenklatur von Bach und Chodat[2]) Oxygenasen und Peroxydasen nebeneinander vorhanden zu sein.

Ebenso färbte sich endlich eine (1proz.) Lösung von Hydrochinon mit dem Extrakt in kurzer Zeit tief dunkelbraun, und das Ausbleiben dieser Färbung in den Kontrollproben mit aufgekochtem Material machte eine Fermentwirkung wahrscheinlich. Doch sind über diese Reaktion meine Versuche noch nicht völlig abgeschlossen.

Im Laufe des nächsten Sommers hoffe ich auf diese, sowie einige andere der angedeuteten Fragen zurückkommen zu können und auch meine Beobachtungen über die Kohlenhydratenzyme zum Abschluß zu bringen.

Vorliegende Arbeit wurde auf Anregung von Herrn Prof. Hofmeister im physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg begonnen und zum Teil durchgeführt, dann im botanischen Institut der Universität Bonn fortgesetzt. Herr Prof. Hofmeister hatte die Liebenswürdigkeit, mich während dieser ganzen Zeit durch seine wertvollen Ratschläge zu unterstützen, wofür ich ihm auch an dieser Stelle meinen Dank aussprechen möchte.

---

[1]) Etwa derart wie Fürth u. Schneider, l. c. S. 234, für die Körperflüssigkeit von Schmetterlingspuppen angeben.

[2]) Biochemisches Centralblatt **1**, 417.

XIV.

Zur Kenntnis der Eiweißpeptone.

Zweite Mitteilung[1]).

Über die durch Jodquecksilberkalium fällbaren Peptone des Blutalbumins.

Von **H. S. Raper** (London).

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

In Verfolg der von L. B. Stookey gesammelten Erfahrungen habe ich mich auf die Untersuchung der als Jodquecksilberniederschlag bezeichneten Peptonfraktion beschränkt. Da das wesentlichste Hindernis für die Trennung und Charakterisierung der Verdauungsprodukte in dem Umstande liegt, daß ihre Zahl eine sehr große und infolgedessen die Ausbeute an einzelnen besser charakterisierten Individuen eine unzureichende ist, bin ich von noch größeren Mengen Rohmaterials ausgegangen als Stookey. Es wurden in drei verschiedenen Versuchen 12 kg Blutalbumin mit Pepsin und Schwefelsäure verdaut. Da es mir auf Darstellung der von der Muttersubstanz schon ziemlich weit abliegenden Jodquecksilberfraktion ankam, wurde die Verdauung viel länger — jedesmal auf 6 Wochen — ausgedehnt.

Die Verarbeitung entsprach zunächst dem von Stookey mitgeteilten Vorgehen. Die neutralisierte Verdauungslösung wurde zunächst durch Sättigung mit Ammonsulfat vom größten Teile der Albumosen befreit; dann wurde Picks Albumose C durch Zusatz von Kupfersulfat entfernt, das Filtrat nach Beseitigung des Kupfers mit Eisenammonalaun ausgefällt. Alle Fällungen wurden in ammonsulfatgesättigter neutraler Lösung vorgenommen.

Aus dem Filtrat der Eisenfällung wurde das Eisen mit Schwefelwasserstoff unter vorsichtigem Zusatz von Ammoniak entfernt, die erhaltene wenig gefärbte Peptonlösung dann neuerdings

---

[1]) Vgl. die erste Mitteilung von L. B. Stookey, diese Beiträge 7, 590.

mit Ammonsulfat gesättigt und mit einer salzgesättigten Lösung von Jodquecksilber in Jodkaliumlösung bei schwach saurer Reaktion völlig ausgefällt.

Die Fällungsflüssigkeit wurde, wie folgt, bereitet: 50 g Quecksilberjodid wurden in 700 ccm Wasser aufgeschwemmt, dazu wurde festes Kaliumjodid in kleinen Mengen zugefügt, bis alles in Lösung ging. Dann wurde festes Ammonsulfat eingetragen, bis sich ein gelber kristallinischer Niederschlag zu bilden begann, und filtriert.

Die Peptonlösung wurde ebenso wie die Fällungsflüssigkeit vor dem Zusatz mit verdünnter Schwefelsäure leicht sauer gemacht. Das Filtrat vom Jodquecksilberniederschlag gab noch Biuretreaktion.

Der Jodquecksilber-Peptonniederschlag wurde als zähe braungelbe Masse erhalten, und zwar war der zuletzt ausfallende Anteil viel dünnflüssiger als der zuerst erhaltene. Er wurde in einer kleinen Menge Kaliumjodidlösung gelöst und daraus durch Eintragen von festem Ammonsulfat wieder abgeschieden. Der so erhaltene Niederschlag wurde dreimal mit je 500 ccm Wasser ausgezogen. Etwa zwei Drittel des Niederschlages lösten sich in Wasser, der Rest war unlöslich. Da die von Stookey erhaltene Jodquecksilberfällung in Wasser unlöslich war, so hat anscheinend die Dauer der Verdauung einen erheblichen Einfluß auf die Natur der erhaltenen Produkte. Auch löste sich der von mir erhaltene wasserunlösliche Teil ganz in 5 proz. Ammoniumcarbonatlösung, während Stookey einen erheblichen Teil darin unlöslich fand. Ich bin dem in Ammoncarbonat unlöslichen Anteil nur in einem von den drei Verdauungsversuchen begegnet und auch da war seine Menge sehr gering.

Der Einfachheit wegen bezeichne ich die Peptonfraktion, deren Jodquecksilberverbindung in 5 proz. Ammoncarbonat, aber nicht in Wasser löslich ist, als Fraktion A, das analoge in Wasser lösliche Produkt als Fraktion B.

Aus beiden Fraktionen wurde das Quecksilber mit Schwefelwasserstoff, das Ammonsulfat durch Zusatz von Baryt bis zur Bindung aller Schwefelsäure und anhaltendes Luftdurchleiten entfernt. Das Jod wurde mit Bleiacetat in schwach saurer Lösung beseitigt.

Die Fraktion B war zum Teil in Alkohol löslich. Ihre Lösung wurde daher bei einer 60° nicht übersteigenden Temperatur zum Sirup eingeengt, dieser dann wiederholt mit einem Liter absoluten Alkohols durchgeknetet. Der ungelöste Anteil Bβ wurde für sich untersucht. Das alkoholische Extrakt wurde im Vakuum ab-

destilliert und ließ den sirupösen Rückstand Bα. Nachstehend ein Schema der durchgeführten Fraktionierung:

K_2HgJ_4-Niederschlag,
behandelt mit Wasser.

Unlöslicher Teil (A), löslich in 5 proz. Ammoncarbonat.	Löslicher Teil (B), nach Beseitigung von Hg und J mit Alkohol extrahiert.
	Löslich in Alkohol (Bα), unlöslich in Alkohol (Bβ).

Diese drei Fraktionen wurden gesondert untersucht. Die Verarbeitung von Fraktion A erstreckte sich auf die entsprechenden Produkte aus allen drei Verdauungsversuchen. Hingegen konnte von Fraktion B nur das Material eines Verdauungsversuches aufgearbeitet werden.

Wie Stookey ging ich darauf aus, diese Fraktionen durch Überführung in besser charakterisierte Derivate weiter zu zerlegen. Von den so erhaltenen Produkten entsprachen einige, so namentlich die aus Fraktion A erhaltenen Phenylisocyanatverbindungen, sehr annähernd den Ansprüchen, die man an ein chemisches Individuum stellen kann. Zwei davon sind von mir genauer untersucht worden. Betreffs der übrigen Produkte kann ich mich auf eine mehr summarische Darstellung beschränken. Sie ganz mit Stillschweigen zu übergehen, scheint mir nicht empfehlenswert, da die dabei gesammelten Erfahrungen für weitere Untersuchungen nicht wertlos sein dürften.

Fraktion A.

Die nach Beseitigung von Quecksilber und Jod erhaltene Lösung dieser Fraktion enthielt noch Ammoniumacetat. Sie wurde dann mit etwas mehr einer 8 proz. Natronlauge versetzt, als zum Freimachen des Ammoniaks nötig war, dann der Destillation bei Zimmertemperatur unter vermindertem Druck unterworfen. Die zurückbleibende alkalische Flüssigkeit wurde mit Salzsäure neutralisiert und bei 60° auf ein kleines Volum gebracht.

β-Naphtalinsulfoprodukt aus Fraktion A. Das nach E. Fischers Verfahren mit β-Naphtalinsulfochlorid erhaltene Produkt fiel auf Ansäuern aus der alkoholischen Lösung als zähe blaßgelbe Masse aus, die nach einigen Stunden fest wurde, ohne jedoch kristallinische Beschaffenheit anzunehmen. Das Rohprodukt, in Ammoniak gelöst und mit Säure gefällt, schmolz im Vakuum getrocknet von 130 bis 170°. Durch siedenden absoluten Alkohol wurde daraus, der Menge nach überwiegend, ein in Alkohol löslicher Anteil mit unscharfem Schmelzpunkt (130 bis 160°) und ein darin unlöslicher Anteil

(Schmelzpunkt 150 bis 168°) erhalten. Bei dem Versuche, diese Produkte über das Barytsalz zu reinigen, änderten sich die Schmelzpunkte nicht.

Phenylisocyanatverbindungen aus Fraktion A. Sie wurden durch Schütteln der schwach alkalischen Peptonlösung mit Phenylisocyanat bei 0° erhalten. Es wurden von dem Reagens stets nur einige Tropfen auf einmal zugesetzt, nach jedem Zusatz wurde gut geschüttelt und scharf gekühlt. Unter sorgfältigem Einhalten alkalischer Reaktion wurde mit dem Zusatz fortgefahren, bis sich die Flüssigkeit durch Ausscheidung von Diphenylharnstoff milchig zu trüben begann. Gegen das Ende der Reaktion begann sich, namentlich wegen des hohen Gehaltes der Flüssigkeit an Natriumacetat, das Natronsalz der Phenylisocyanatverbindung auszuscheiden. Zum Schluß wurde mit Essigsäure angesäuert, die ausgefällte Phenylisocyanatverbindung abfiltriert und mit kaltem Wasser gewaschen. Zur Entfernung des Diphenylharnstoffs wurde die Substanz im Vakuum getrocknet, gepulvert und im Soxhletapparat 9 Stunden mit Äther extrahiert. Dann wurde neuerdings getrocknet, gepulvert und die Extraktion wiederholt, bis kein Diphenylharnstoff mehr überging.

Neben diesem fand sich im Äther eine kleine Menge einer öligen Substanz, die Biuretreaktion gab, und von ihm mit Ammoniak getrennt werden konnte. Da sie stets im ersten Extrakt auftrat, ist sie wohl als ein besonderer Bestandteil des Phenylisocyanat-Peptongemenges anzusehen, nicht etwa als ein in Äther in Lösung gegangener Anteil des zurückbleibenden Hauptproduktes. Sie hatte keinen scharfen Schmelzpunkt und wurde, der kleinen Menge wegen, nicht näher untersucht.

Die weitere Reinigung des Hauptproduktes gelang nach mancherlei mißlungenen Versuchen durch Fällung des Natronsalzes mittels Kohlensäure. Die feinverriebene Substanz wurde in der eben notwendigen Menge Natronlauge gelöst, dann Wasser zugefügt, bis die Konzentration annähernd 1 Proz. betrug; dann wurde Kochsalz, für je 100 ccm 3 g, zugesetzt und Kohlensäure bis zur Sättigung durchgeleitet. Dabei fiel ein Teil der Substanz in Form eines voluminösen gelatinösen Niederschlages. Er wurde möglichst rasch abzentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abgegossen, der Niederschlag aufs Filter gebracht und abgesaugt, bis er eine feste gelatinöse Masse bildete. Um ihn vom Papier zu trennen, wurde das Filter samt Niederschlag mit verdünnter warmer Essigsäure behandelt, wodurch der Niederschlag hart und ablösbar wurde.

Das Filtrat von der Kohlensäurefällung, sowie die beim Zentrifugieren erhaltene Flüssigkeit, wurde mit Essigsäure angesäuert, der so erhaltene

Niederschlag abfiltriert und mit kaltem Wasser, worin er praktisch unlöslich war, ausgewaschen. Vakuumtrocken schmolz die erhaltene Substanz bei 140 bis 160°, zuletzt unter Zersetzung. Versuche, das offenbar vorliegende Gemenge weiter zu zerlegen, waren nur zum Teil von Erfolg. Am besten bewährte es sich, die Substanz in möglichst wenig Ammoniak zu lösen, stark zu verdünnen und nun mit Baryumchlorid zu fällen. Aus dem ausfallenden, schwierig löslichen Baryumsalz, konnte eine Säure erhalten werden, die durch wiederholtes Umfällen bei 155 bis 160° unter Zersetzung schmolz. Die Säure des in Lösung gebliebenen Barytsatzes schmolz nach der ersten Fällung bei 82 bis 118°. Der Versuch, die Substanzen durch Erwärmen mit Säure in ein Hydantoin umzuwandeln, führte nicht zum Ziel. Veresterung mit Äthylalkohol gab ein in Schmelzpunkt und Löslichkeit abweichendes Produkt, das jedoch nicht weiter untersucht wurde.

Erfolgreicher war die Bearbeitung des Kohlensäureniederschlags. Der trockene Niederschlag ließ sich durch siedenden absoluten Alkohol ziemlich scharf in drei Körper zerlegen; der eine war in kochendem Alkohol unlöslich, der zweite löste sich darin in ziemlicher Menge, fiel aber beim Erkalten nahezu ganz wieder aus, der dritte blieb im kalten Alkohol gelöst zurück.

Es kamen 30 ccm absoluten Alkohols auf das Gramm Substanz zur Verwendung. Die Extraktion wurde im Wasserbade unter dem Rückflußkühler bis zur Sättigung des Alkohols fortgesetzt. Der ungelöst bleibende Rückstand (a) wurde heiß abfiltriert, die Flüssigkeit für zwei Tage in den Eiskasten gestellt, dann von dem ausgeschiedenen Körper (b) abfiltriert, schließlich das Filtrat im Wasserbade vom Alkohol befreit, wobei ein blaßgelber öliger Rückstand (c) zurückblieb.

Die Phenylisocyanatverbindung Aa wurde aus der ersten Darstellung nur in geringer Menge erhalten. Sie schmolz bei 185 bis 190°. Durch Lösen in heißem 70 proz. Alkohol und Abkühlenlassen konnte sie gereinigt werden. Sie schied sich dabei in warzigen Massen aus, die konzentrisches Wachstum zeigten, aber nicht doppeltbrechend waren. Die Ausbeute an reiner Substanz betrug bei der Darstellung aus der ersten Verdauungsflüssigkeit nur 0,1 g (auf 4 kg Blutalbumin!). Gereinigt schmolz sie bei 203 bis 205° unter Zersetzung. Sie gab nur die Biuret- und die Xanthoproteïnprobe.

Bei der Darstellung aus dem zweiten und dritten Verdauungsversuche wurde die Substanz nicht erhalten. Hingegen fand sich hier eine erhebliche Menge einer in siedendem Alkohol unlöslichen Substanz, die von der obigen verschieden war, da sie sich aus 70 proz. Alkohol ölig ausschied. Aus 90 proz. Alkohol fiel sie gelatinös aus. Nach zweimaligem Umfällen aus 90 proz. Alkohol

schmolz sie scharf bei 191° unter Zersetzung. Sie gab nur die Biuretreaktion. Die weitere Untersuchung steht noch aus.

Die Phenylisocyanatverbindung Ab wurde bei der Darstellung aus dem ersten Verdauungsversuch nur in kleiner Menge, reichlicher bei den weiteren zwei Darstellungen erhalten. Sie schied sich aus der heißen alkoholischen Lösung als weißes amorphes Pulver aus, das bei 171 bis 173° unter Zersetzung schmolz. Durch wiederholtes Auflösen in wenig 90 proz. Alkohol, wobei noch etwas unlösliche Substanz, vermutlich a, zurückblieb, und Auflösung mit Aceton, stieg der Schmelzpunkt auf 178 bis 180° und blieb dann bei Wiederholung dieses Reinigungsverfahrens unverändert. Die Ausbeute betrug 2 g auf 4 kg Blutalbumin.

Der Körper gab bloß die Biuret- und Xanthoproteïnreaktion. Alle Versuche, ihn in Kristallform zu erhalten, scheiterten.

0,1012 g gaben 0,2063 g CO_2 = 55,59 Proz. C und 0,0612 g H_2O = 6,77 Proz. H
0,1168 g gaben 17,9 ccm N bei 20° und 713 mm Hg = 16,46 Proz. N.

0,4259 g verbrauchten in 90 proz. Alkohol gelöst zur Neutralisation gegen Phenolphtaleïn 5,97 ccm n/10-Lauge, was einem niedrigsten Molekulargewicht von 713 entspräche. Daraus berechnet sich als einfachster Ausdruck die Formel $C_{32}H_{46}N_8O_9$.

	Gefunden:	Berechnet:
C	55,59 Proz.	55,93 Proz.
H	6,77 „	6,75 „
N	16,46 „	16,34 „
O	21,18 „	20,98 „
Mol.-Gewicht	713	681,4

Um die Zahl der im Molekül vorhandenen Phenylisocyanatgruppen zu ermitteln, habe ich die entsprechende Bromphenylisocyanatverbindung dargestellt.

Zur Gewinnung des benötigten p-Bromphenylisocyanats wurde Phenylurethan in Eisessig bromiert, was rascher zum Ziele führt als das von Behrend[1]) angegebene Verfahren, das Bromphenylurethan aus Ligroin umkristallisiert, dann nach Dennstedts[2]) Vorgang mit Phosphorpentoxyd behandelt. Da das p-Bromphenylisocyanat bei gewöhnlicher Temperatur fest ist, wurde es in ätherischer Lösung verwendet.

Die Darstellung und Reinigung der Peptonverbindung war die für das Phenylisocyanat beschriebene. Das Produkt war in Alkohol weniger löslich, so daß bei der Isolierung auf ein Gramm 40 ccm Alkohol genommen werden mußten. Da nur wenig Ausgangsmaterial zur Darstellung verwendet werden konnte, war das Produkt vielleicht weniger rein als die Phenylisocyanatverbindung,

---

[1]) Annalen der Chemie 233, 7.
[2]) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. 13, 228.

doch durfte man von seiner Analyse zum mindesten einen Aufschluß über die Zahl der eingetretenen Phenylcarbonimidgruppen erwarten.

Aus Alkohol fiel es als weißes amorphes Pulver aus, das bei 174 bis 176° schmolz. Es wurde durch Lösen in 90 proz. Alkohol, Filtration und Fällung mit Aceton gereinigt, sinterte jetzt bei 182° und schmolz bei 184 bis 185° unter Zersetzung.

0,1086 g gaben 0,0368 g AgBr = 14,42 Proz.
Die Formel $C_{64}H_{89}Br_3N_{16}O_{18}$ verlangt 14,89 Proz. Br.

Danach ist die oben berechnete Molekularformel zu verdoppeln. Unter Zugrundelegung der Annahme, daß 3 Mol. Phenylisocyanat an das ursprüngliche Polypeptid herantreten, ergibt sich für dieses die Formel $C_{43}H_{77}N_{13}O_{15}$.

Da nur zwei Gramm der reinen Substanz erhalten worden waren, mußte von der Hydrolyse bis zur Darstellung neuen Materials abgesehen werden.

Phenylisocyanatverbindung Ac. Wie erwähnt, wurde diese Verbindung als gelbliches Öl aus dem Alkoholfiltrat von b erhalten. Um festzustellen, ob noch ein Rest von b vorhanden war, wurde die Lösung auf die Hälfte des ursprünglichen Volums eingeengt und 24 Stunden im Eiskasten stehen gelassen. Es schied sich aber nichts mehr aus.

Die ölige Substanz wurde nun in verdünnter Natronlauge gelöst und die dickliche gelatinöse Lösung mit Essigsäure gefällt. Der im Vakuum getrocknete Niederschlag schmolz bei 159 bis 163°. Nach Extraktion mit wasserfreiem Aceton, wobei etwas Ester beseitigt wurde, der sich beim Kochen mit absolutem Alkohol gebildet hatte, stieg der Schmelzpunkt auf 169 bis 170° und blieb, trotz verschiedener weiterer Reinigungsversuche, konstant. Beim Schmelzen trat Gasentwicklung ein. Die Substanz gab die Biuret-, Millonsche und Xanthoproteïnreaktion. Sie schied sich aus allen Lösungsmitteln in warzigen, gelatinösen Massen aus, die ein konzentrisches Wachstum, aber keine kristallinische Struktur zeigten. Die Ausbeute betrug ein Gramm reine Substanz pro Kilogramm Eiweiß.

Die Substanz wurde im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

Präparat I.

0,1281 g Substanz gab 0,2681 CO_2 = 57,09 Proz. C u. 0,0790 g H_2O = 6,90 Proz. H.
0,1121 „ „ „ 16,0 ccm N bei 16° und 710 mm Druck = 15,55 Proz. N.

Durch Titration mit n/10-NaOH wurde in alkoholischer Lösung gegen Phenolphtaleïn das Molekulargewicht ermittelt.

0,6331 g benötigten 9,04 ccm n/10-Na OH Mol.-Gew. = 699
0,9856 „ „ 14,00 „ „ „ „ = 704

Präparat II (aus einer anderen Verdauungslösung).

0,1730 g Substanz gaben 0,3663 CO_2 = 37,76 Proz. C u. 0,1136 H_2O = 7,35 Proz. H.
0,1526 „ „ verbrauchten bei Kjeldahlbestimmung 17,25 ccm n/10-Säure = 15,73 Proz. N.
0,7661 g „ benötigten zur Neutralisation 10,52 ccm n/10-Lauge. Mol.-Gewicht 727.

	Gefunden:			Berechnet:
	I	II	Mittel	für $C_{34}H_{48}N_8O_9$
C	57,09 Proz.	57,76 Proz.	57,43 Proz.	57,26
H	6,90 „	7,35 „	7,12 „	6,79
N	15,55 „	15,73 „	15,64 „	15,74
O (ber.) . .	— „	— „	19,81 „	20,21
Mol.-Gew. .	699 704	727	710	707,2

Um die Zahl der eingetretenen Phenylisocyanatgruppen zu bestimmen, wurde aus der ursprünglichen Peptonlösung die p-Bromphenylisocyanatverbindung hergestellt. Die dem Phenylisocyanatprodukt sehr ähnliche Substanz schmolz bei 173 bis 175° und war in den angeführten Lösungsmitteln weniger löslich.

0 1622 g geben 0,0657 g Ag Br = 17,24 Proz. Br.

Die Formel $C_{34}H_{46}Br_2N_8O_9$ verlangt 18,37 Proz., die Formel $C_{34}H_{47}BrN_8O_9$ nur 10,10 Proz. Brom.

Trotz der nicht befriedigenden Übereinstimmung, die in der geringen, eine weitere Reinigung nicht gestattenden Ausbeute begründet sein mag, kann kein Zweifel sein, daß es sich um eine zweibasische Säure handelt und das angegebene Molekulargewicht zu verdoppeln ist. Dafür spricht auch das Ergebnis einer Bestimmung des Molekulargewichts durch Gefrierpunkts-Depression. 0,5308 g in 7,17 g Eisessig gaben eine Depression von 0,243°, woraus sich ein Molekulargewicht von 1188 berechnet. Daß die Zahl von der theoretisch erwarteten (1414) so stark abweicht, liegt wohl an der Schwierigkeit, den Eisessig während des Versuches völlig trocken zu erhalten. Immerhin kann bei der Wahl zwischen den zwei möglichen Zahlen (707 und 1414) die Entscheidung nur auf die höhere fallen. Es muß daher die Formel des Produkts vorläufig zu $C_{68}H_{96}N_{16}O_{18}$ und jene des zugehörigen Peptons zu $C_{40}H_{76}N_{12}O_{14}$ angenommen werden.

Stickstoffverteilung in dem Phenylisocyanatprodukt Ac.

Um eine annähernde Vorstellung über die Konstitution dieses Polypeptids zu erhalten, wurde darin die Stickstoffverteilung nach

dem Verfahren von Hausmann[1]) untersucht. Dabei war zu erwarten, daß aus den Phenylisocyanatgruppen bei der Hydrolyse Anilin entstehen und als flüchtige, aber nicht titrierbare Base in der „Amidstickstoff"-Fraktion auftreten müßte.

0,5284 g wurden mit siedender konzentrierter Salzsäure zerlegt, die Salzsäure im Vakuum, soweit möglich, abdestilliert, die Flüssigkeit unter Zusatz von so viel Schwefelsäure, daß sie 5 Proz. enthielt, auf 100 ccm gebracht. In 25 ccm davon wurde alles mit Phosphorwolframsäure Fällbare ausgefällt, im Niederschlag der Stickstoff bestimmt. Ebenso wurde der Stickstoff des Filtrats bestimmt. Ferner wurde in 40 ccm durch Destillation mit Magnesia und Filtration das abgespaltene Ammoniak ermittelt.

Es wurden erhalten auf die gesamte Substanz berechnet:

1. im Phosphorwolframsäure-Niederschlag 0,0326 g N = 6,17 Proz. N,
2. im Filtrat 0,0538 g N = 10,18 Proz. N,
3. als Ammoniak = 0,00997 = 1,88 Proz.

Von dem gesamten in 1. und 2. erhaltenen Sticktoff der Substanz entfallen demnach 37,7 Proz. auf den durch Phosphorwolframsäure fällbaren N (Amid- und Diamino-N), 62,3 Proz. auf das Filtrat, 11,5 Proz. auf Ammoniak (Amid-N), auf den durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoff nach Abzug des Ammoniakstickstoffs (Diamino-N) 25,8 Proz.

In den 62,3 Proz. Filtratstickstoff ist der Anilin- und Monaminostickstoff enthalten. Das Verhältnis dieser Anteile wurde folgendermaßen festgestellt:

0,5337 g Substanz wurden wie oben hydrolysiert, dann das Ammoniak und Anilin durch Destillation mit Magnesia im Vakuum übergetrieben, die Flüssigkeit von der Magnesia abfiltriert, mit Wasser unter Zusatz von 5proz. Schwefelsäure auf 100 ccm gebracht. 25 ccm wurden nun mit Phosphorwolframsäure gefällt und der Stickstoff im Filtrat bestimmt. Die Menge des Monaminostickstoffs betrug, auf die gesamte Substanz berechnet, 0,029 96 g = 5,61 Proz., oder 35,9 Proz. des Gesamtstickstoffs. Auf Anilin entfallen somit 62,3 weniger 35,9 = 26,4 Proz. des Gesamtstickstoffs.

Es ergibt sich hieraus folgende Verteilung des Stickstoffs:

Gefunden:		Berechnet auf 16 Atome N = 100:	
Ammoniak-N .	= 11,5 Proz.	für 2 N	12,5 Proz.
Anilin-N . . .	= 26,4 „	„ 4 N	25,0 „
„Diamino"-N .	= 25,8 „	„ 4 N	25,0 „
„Monamino"-N	= 35,9 „	„ 6 N	37,5 „

Die Menge des gefundenen Anilins entspricht der bereits oben begründeten Annahme, daß das Phenylisocyanatprodukt vier Phenylisocyanatgruppen enthält.

---

[1]) Hausmann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 95 u. 29, 136. — Gümbel, Diese Beiträge 5, 297. — Rothera, ebenda 5, 442.

Hydrolyse des Phenylisocyanatprodukts Ac. 5 g der Substanz wurden durch fünfstündiges Kochen mit konzentrierter Salzsäure gespalten. Obgleich die Substanz keine Tryptophanreaktion darbot, nahm die Lösung eine tiefviolette Färbung an, die beim Beginn des Siedens wieder verschwand. Die Flüssigkeit wurde dann durch Destillation unter vermindertem Druck, soweit möglich, von Salzsäure befreit, dann der braune Rückstand, in dem Hydantoinverbindungen der Aminosäuren zu vermuten waren, für 24 Stunden in Eis gestellt. Es schied sich aber nur ein wenig braunes Öl aus, das, abfiltriert, sich in kochendem Wasser löste und beim Erkalten wieder ölig ausschied. Das Filtrat wurde mit 5 proz. Schwefelsäure auf 600 ccm gebracht und mit Phosphorwolframsäure ausgefällt, der Niederschlag abfiltriert, nochmals mit 5 proz. Schwefelsäure verrieben und scharf abgesaugt.

Der Phosphorwolframsäure-Niederschlag wurde unter Erwärmen mit Baryt zerlegt, das Filtrat vom Baryumphosphorwolframat mit Kohlensäure vom Barytüberschuß befreit und die erhaltene stark alkalisch reagierende Lösung nach Abfiltirieren der sich ausscheidenden geringen Menge von Baryumcarbonat eingeengt. Da es in Vorproben nicht gelang, durch Quecksilberchlorid Histidin und durch entsprechende Behandlung mit Kupferoxyd Arginin nachzuweisen, wurde die Lösung eingeengt. Als sie sirupös zu werden begann, schied sich eine kristallinische Substanz aus, die äußerlich an Leucin erinnerte, aber in kaltem Wasser schwerlöslich war. Um sie von Lysin, dessen Anwesenheit durch Vorproben wahrscheinlich geworden war, zu trennen, wurde die Lösung so weit eingeengt, daß sie zu einem Kristallbrei erstarrte. Nach dem Erkalten wurde die Masse mit kaltem Wasser verrieben, wobei etwa die Hälfte der Masse als kristallinisches weißes Pulver zurückblieb, das abfiltriert und mit kaltem Wasser ausgewaschen wurde. Die Ausbeute aus der Rohverbindung betrug etwa 0,4 g. Sie enthielt nach einer vorläufig mit sehr wenig Substanz ausgeführten Bestimmung 16,6 Proz. N.

Diese schwerlösliche Base wurde durch Umkristallisieren aus 70 proz. Alkohol gereinigt. Nach zwei- und dreimaligem Umkristallisieren schmolz sie bei 231 bis 233° unter Gasentwickelung. Sie schied sich aus 70 proz. Alkohol in rosettenförmig angeordneten Pyramiden aus. In kaltem Wasser war sie wenig, besser in kochendem löslich; die Lösungen zeigten alkalische Reaktion, die beim Umkristallisieren — vermutlich durch Entfernung von beigemengtem Lysin —, schwächer wurde. In absolutem Alkohol war die Substanz unlöslich, wohl aber ziemlich löslich in heißem 70 proz. Alkohol. In Säuren und Alkalien löste sie sich leicht.

0,1016 g gaben 0,2214 g CO_2 = 59,43 Proz. C und 0,0653 g H_2O = 7,18 Proz. H.

Leider reichte die umkristallisierte Substanz nicht zu einer Stickstoffbestimmung. Die Klarstellung ihrer Natur muß weiterer Untersuchung vorbehalten bleiben.

Die von der schwerlöslichen Base abfiltrierte Lösung wurde zum Sirup eingeengt, dann mit alkoholischer Pikrinsäurelösung versetzt, bis kein Niederschlag mehr entstand. Das erhaltene, zunächst etwas ölige Pikrat wurde mit absolutem Alkohol ausgewaschen und wog trocken 1,2 g. Nach zweimaligem Umkristallisieren wurde es in schönen gelben Nadeln von dem Aus-

sehen des Pikrats des Lysins erhalten. Es wurde in das Chloroplatinat übergeführt, das aus Alkohol in orangegelben Prismen kristallisierte und nach dem Trocknen im Vakuum 34,65 Proz. Pt (berechnet 35,70 Proz.) enthielt.

Das Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag wurde mit Baryt schwach alkalisch gemacht, der Niederschlag vom Sulfat und Phosphorwolframat abfiltriert und mit kochendem Wasser gut ausgewaschen, die gesamte Lösung mit Salzsäure angesäuert, auf ein kleines Volumen gebracht, dann mit Barythydrat alkalisch gemacht und mit Äther ausgeschüttelt. Das alkalische Ätherextrakt enthielt Anilin und daneben eine kleine Menge einer in verdünnter Salzsäure unlöslichen Substanz. Sie ging aus der angesäuerten Lösung in Äther über, der sie beim Verdunsten als braunes Öl hinterließ, das beim Erkalten kristallinisch erstarrte. Aus kochendem Wasser wurde die Substanz in federförmig angeordneten Nadelgruppen erhalten. Nach dreimaligem Umkristallisieren schmolz sie scharf bei 110 bis 111°.

Die alkalische, mit Äther erschöpfte Flüssigkeit wurde nun mit Schwefelsäure vom Baryt befreit, auf ein Volumen von 6 ccm eingeengt, mit Salzsäuregas gesättigt und auf Eis gestellt. — Es schieden sich binnen 48 Stdn. Kriställchen aus, deren Menge jedoch zur Identifizierung als Glutaminsäurechlorhydrat nicht reichte. Es wurde davon abfiltriert und aus dem Filtrat die Salzsäure mit Blei- und zuletzt mit Silbercarbonat entfernt. Nach Beseitigung des Bleis und Silbers wurde mit Baryumcarbonat gekocht, und die erhaltene Lösung mit Alkohol gefällt. Es wurde ein zähes, gelbliches Barytsalz erhalten, das mit 90 proz. Alkohol ausgezogen und genau mit Schwefelsäure zerlegt wurde. Die resultierende barytfreie Lösung, in der Glutaminsäure (und Asparaginsäure) zu vermuten war, wurde neuerdings mit Salzsäure angesäuert, auf ein ganz kleines Volumen gebracht und mit Chlorwasserstoffgas gesättigt. In der Tat schieden sich beim Stehen in der Kälte neuerdings feine Nädelchen, von dem äußeren Verhalten der salzsauren Glutaminsäure, aus. In dem Filtrat davon wurde auf Asparaginsäure durch Überführen in das Kupfersalz gefahndet, doch ohne Erfolg.

Die von dem Barytsalz abfiltrierte alkoholische Lösung wurde nun auf ein kleines Volumen eingeengt, wobei sich Leucin und Tyrosin in typischer Form auszuscheiden begannen. Es wurde nun zur Trockne eingeengt und der Rückstand mit kaltem 60 proz. Alkohol aufgenommen, worin sich Tyrosin so gut wie gar nicht löst. Der ungelöste Teil gab beim Umkristallisieren typische Tyrosinkristalle, die sehr starke Millonsche Reaktion gaben. Die Menge betrug nur etwa 0,05 g.

Die mit 60 proz. Alkohol hergestellte, vom Tyrosin abfiltrierte Lösung wurde zur Trockne gebracht und einigemal mit kaltem absolutem Alkohol ausgezogen. Die vereinigten Extrakte hinterließen eine gelbe, teigige Masse, in der Prolin zu vermuten war. Sie wurde mit Kupferhydroxyd in das tiefblaue Kupfersalz übergeführt, das beim Eindampfen zum Teil in dunkelblauen Prismen kristallisierte und in absolutem Alkohol löslich war. Ein oder zwei Tropfen der wässerigen Lösung mit Natronkalk erhitzt, gaben Pyrrolidingeruch und starke Fichtenspanreaktion. Die Menge des kristallinischen Kupfersalzes reichte nicht für die weitere Reinigung. Doch kann kein Zweifel sein, daß α-Pyrrolidincarbonsäure, vermutlich ein Gemenge der aktiven und racemischen Form, vorlag.

Der in absolutem Alkohol ungelöste Rest machte bei makro- und mikroskopischer Betrachtung den Eindruck von Leucin. Doch enthielt er noch etwas stickstoffreichere Substanz beigemengt. Die Stickstoffbestimmung in dem getrockneten Rohprodukt ergab 11,5 Proz. N, während sich für Leucin 10,5 Proz. berechnet.

Das Produkt wurde in das Kupfersalz übergeführt, das in den typischen blaßblauen Plättchen erhalten wurde, und nach dem Ergebnis der mit einigen Centigramm Substanz ausgeführten Kupferbestimmung annähernd den Kupfergehalt des Leucins (gef. 18,4 Proz., ber. 19,6 Proz.) besaß.

Das Filtrat vom Kupfersalz enthielt nur noch so wenig Substanz, daß die Prüfung auf andere noch etwa vorhandene Aminosäuren aufgegeben werden mußte.

Es waren also als Spaltungsprodukte der Phenylisocyanatverbindung C erhalten bezw. charakterisiert worden:

eine Base mit dem Schmelzp. 231 bis 233°,
Lysin = $C_6H_{14}N_2O_2$,
ein ätherlöslicher Körper vom Schmelzp. 110 bis 111°,
Glutaminsäure = $C_5H_9NO_4$,
Prolin = $C_5H_9NO_2$,
Leucin = $C_6H_{13}NO_2$.
Tyrosin = $C_9H_{11}NO_2$,
Anilin = C_6H_7N
Ammoniak = NH_3.

Was an diesem Ergebnis überrascht, ist weniger die Zahl der in dem Peptonmolekül vereinigten stickstoffhaltigen Kerne — Ähnliches war schon auf Grund des gefundenen Molekulargewichts zu erwarten — als vielmehr deren Mannigfaltigkeit. Ein anscheinend so weit vom ursprünglichen Eiweißmolekül abstehendes Produkt, das sich seinem Molekulargewicht nach aus etwa acht Aminosäuregruppen aufbaut, enthält darunter mindestens fünf oder gar, wenn man die nicht identifizierten Stoffe mit den Schmelzp. 231 bis 233° und 110 bis 111° nicht als irgendwelche Verbindungen der sonst isolierten Produkte auffaßt, mindestens sieben verschiedene Aminosäuren.

Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Aufarbeitung bei der geringen Menge Ausgangsmaterial notwendig eine unvollständige sein mußte, wie ja auch bei dem Abbau der echten Eiweißkörper sich bisher immer noch erhebliche Anteile der Aufklärung entziehen.

Angesichts dieser Tatsachen kann man auf den Gedanken kommen, daß das hydrolysierte Präparat noch fremde Beimengungen enthielt. Namentlich könnte die gefundene geringe Menge des sonst so gut isolierbaren Tyrosins eine solche Deutung nahelegen. Inwieweit solche Bedenken berechtigt sind, dürfte sich bei Fortführung der Untersuchung bald ergeben. Denn jetzt, wo synthetisch durch E. Fischer, mittels Abbau durch diese Untersuchungen gezeigt ist, daß auch die „Peptone“ der modernen chemischen Technik zugänglich zu machen sind, dürfte die Aufklärung dieser Fragen nicht mehr lange auf sich warten lassen.

Fraktion Bα.

β-Naphtalinsulfoprodukt. Es wurde wie das entsprechende Produkt aus Fraktion A bereitet. Vor Behandlung mit Naphtalinsulfochlorid wurde das Ammoniak durch Zusatz der benötigten Menge Natronlauge und Destillation im Vakuum bei Zimmertemperatur entfernt. Nach der Behandlung wurde das Produkt beim Ansäuern als zähe Masse erhalten, die nach zweitägigem Stehen fest, wenn auch nicht kristallinisch wurde. Nach dem Trocknen im Vakuum sinterte die Substanz bei 75° und schmolz unscharf bei 88 bis 122° zuletzt unter Gasentwickelung. Sie war in Methyl- und Äthylalkohol, in Aceton und Phenol löslich, schied sich aber aus allen diesen Lösungsmitteln ölig aus. Eine Trennung des offenbar vorhandenen Gemenges war weder mit Hilfe von Lösungsmitteln, noch durch Überführung in das Natron- und Barytsalz und deren Fraktionierung mit Kohlensäure zu erzielen.

Phenylisocyanatverbindungen aus Fraktion Bα. Die Darstellung des Rohproduktes geschah wie bei Fraktion A. Nach Entfernung des Diphenylharnstoffs im Soxhletapparat schmolz das trockene Produkt von 70 bis 150°. Durch Kohlensäuresättigung der alkalischen Lösung konnte auch hier eine Trennung erzielt werden.

Die Kohlensäurefällung war gering. Mit kochendem 10proz. Alkohol ließ sie sich weiter trennen. Der darin unlösliche Teil ließ sich aus 90proz. Alkohol umkristallisieren und wurde schließlich in farblosen Nadeln erhalten, die bei 258 bis 260° unter Zersetzung schmolzen. Die Substanz war unlöslich in Äther und gab keine Biuretreaktion, auch nicht beim Erhitzen.

Die zweite, in 10proz. Alkohol lösliche Substanz, wurde aus der alkalischen visciden Lösung durch Essigsäure gefällt. Aus ihrer Lösung in 50proz. Alkohol schied sie sich in gallertigen Wärzchen aus. Sie schmolz scharf bei 167 bis 169° und änderte den Schmelzpunkt bei weiterem Reinigen nicht. Sie gab nur die Biuretreaktion, war unlöslich in absolutem Alkohol und Aceton, aber sehr löslich in 90proz. Alkohol und verdünntem Aceton.

Das Filtrat vom Kohlensäureniederschlag enthielt eine durch Essigsäure fällbare Substanz, die zwischen 70 bis 117° schmolz und nicht weiter zerlegt werden konnte.

Fraktion Bβ.

Sie wurde als in absolutem Alkohol unlösliches Pulver erhalten, und wurde im Vakuum getrocknet. Sie gab Biuret-, Xanthoproteïn- und Millons Reaktion, nicht aber Molischs Probe.

Das β-Naphtalinsulfoprodukt wurde wie gewöhnlich dargestellt. Beim Ansäuern der alkalischen Lösung fiel es jedoch nicht ölig, sondern als

weißes, amorphes Pulver aus. Kristallisations- und Trennungsversuche führten nicht zum Ziel. Eine wenigstens teilweise Trennung wurde durch Fällung des Natronsalzes mit gesättigter Kochsalzlösung erzielt. Die Säure des gelöst bleibenden Natronsalzes schmolz bei 95 bis 118° unter Gasentwickelung, jene des Niederschlags nach wiederholtem Umfällen stets bei 120 bis 145°. Annähernd die gleiche Trennung wurde durch Überführung in die Baryumsalze erreicht. Es wurden zwei Fraktionen vom Schmelzp. 75 bis 120° und 118 bis 142° erhalten.

Benzoylprodukte aus Bβ. Die Benzoylierung wurde nach Schotten-Baumann vorgenommen. Aus der alkalischen Lösung schied sich ein alkaliunlösliches Produkt als zähflüssige, blaßgelbe Masse aus. In dem Filtrat blieb eine kleine Menge eines alkalilöslichen Produkts, das auf Ansäuern ausfiel, und von der mit ausfallenden Benzoesäure durch Petroläther getrennt werden konnte. Doch war seine Menge für weitere Untersuchung zu spärlich. Die alkaliunlösliche Masse wurde zuerst mit kaltem Wasser geknetet, dann mit warmem Wasser gewaschen, worauf sie beim Erkalten fest wurde, so daß sie gepulvert und weiter ausgewaschen werden konnte. Das so erhaltene Rohprodukt schmolz bei 75 bis 120° unter Zersetzung. Es konnte zunächst durch Lösungsmittel weiter zerlegt werden. 2 g wurden mit 30 ccm kochendem, wasserfreien Aceton aufgenommen, erkalten gelassen und von einer kleinen Menge ausgeschiedener Substanz, die fast ganz anorganisch war, abfiltriert. Die klare Lösung wurde mit Essigäther versetzt, so lange Fällung erfolgte. Der so erhaltene Niederschlag schmolz bei 150 bis 170° und war jetzt fast ganz unlöslich in Aceton. Durch Behandlung mit Aceton konnte der Schmelzp. auf 168 bis 180° erhöht werden.

Das Filtrat von der Essigätherfällung wurde eingeengt und mit Petroläther gefällt. Dieses Hauptprodukt der Benzoylierung konnte durch dreimaliges Lösen in Aceton und Fällen mit Petroläther als gelblichweiße feste Masse erhalten werden, die bei 145° zu sintern begann und bei 150 bis 156° unter Zersetzung schmolz. Sie gab keine Reaktion nach Molisch.

Phenylisocyanatprodukt aus Bβ. Es wurde wie die analogen Produkte bereitet. Beachtenswert ist, daß es, vermutlich weil die Trennung von Bα und Bβ mit absolutem Alkohol nicht ganz scharf ist, eine kleine Menge der bei 167 bis 169° schmelzenden Substanz lieferte, die aus Bα dargestellt worden war.

Die Versuche Stookeys haben bereits gezeigt, daß die von Hofmeister empfohlene Kombination von Salzfällung, Metallfällung und Überführung in Kondensationsprodukte es ermöglicht, aus dem schwer entwirrbaren Gemenge der Verdauungsprodukte einzelne besser charakterisierte Polypetide zu isolieren. Die eben mitgeteilten Versuche lehren, daß die Zahl derartiger Produkte nicht gering ist. Besondere Eignung für solche Isolierungsversuche scheint dem Phenylisocyanat zuzukommen. Von anscheinend homogenen Verbindungen, die einen konstanten Schmelzpunkt aufweisen, seien hier nur die Phenylisocyanate von Aa (Schmelzp. 203

bis 205°), von Aa (Schmelzp. 191°), von Ab (Schmelzp. 178 bis 180°), von Ac (Schmelzp. 169 bis 170°) und von Bα (Schmelzp. 167 bis 169°) angeführt.

Keine dieser Verbindungen konnte in Kristallen erhalten werden. Fast alle aber haben das Vermögen, aus ihren Lösungen in warzenartig angeordneten oder pulverförmigen Ausscheidungen auszufallen, die ohne Zuhilfenahme des Mikroskops nicht von „mikrokristallinischen" zu unterscheiden sind. Aus ganz verschiedenen Darstellungen herrührende Präparate zeigten nach genügender Reinigung den gleichen Schmelzpunkt, die gleichen Löslichkeitsverhältnisse und Reaktionen, und, soweit ich zu untersuchen Gelegenheit hatte, die gleiche Zusammensetzung. Man darf sie daher trotz des Mangels der Kristallisierbarkeit als chemische Individuen ansehen. Aber auch wenn man sie bloß als Gemenge von konstanter Zusammensetzung und konstanten Eigenschaften ansehen wollte, so wäre das für die praktische Verfolgung der Hauptfrage — des chemischen Baues der Peptone — kein Hindernis. Denn ob Individuen oder konstant zusammengesetzte Gemenge, in jedem Falle sind sie wertvolle Ausgangsprodukte der weiteren Forschung.

Kürzere Mitteilungen.

2. Einwirkung von Säureanhydriden auf Kreatin und Kreatinin.

Von **F. Urano** (aus Nagasaki).

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Während es nicht gelingt, durch Benzoylierung von Kreatin nach Schotten-Baumann zu Benzoylkreatin oder Benzoylkreatinin zu gelangen, erhält man, wie Erlenmeyer jun. gefunden hat, durch Einwirkung von Essigsäureanhydrid auf Kreatin Diacetylkreatin [1]. Es war danach zu vermuten, daß sich die Acylierung des Kreatins auch durch andere Säureanhydride würde erzielen lassen.

Einwirkung von Benzoësäureanhydrid.

10 g Benzoësäureanhydrid werden in einem Erlenmeyerkölbchen von 50 ccm Inhalt im Ölbad zum Schmelzen gebracht, dazu 2,5 g fein gepulvertes Kreatin zugefügt und die Masse etwa 2 Stunden bei 120° gehalten. Sie färbt sich dabei erst hell-, dann dunkelgelb, während zugleich das erst suspendierte Kreatin allmählich verschwindet. Ist die geschmolzene Masse ganz klar geworden, so läßt man erstarren, extrahiert im Soxhletapparat das überschüssige Benzoësäureanhydrid mit Äther, löst den Rückstand in möglichst wenig ammoniakalischem Wasser und säuert tropfenweise mit Essigsäure an. Dabei scheidet sich das Produkt, wenn auch mit einigem Verlust, als gelber kristallinischer Niederschlag aus. Er wird aus 95 proz. Alkohol bis zur möglichsten Entfärbung und konstantem Schmelzpunkt umkristallisiert.

Ausbeute etwa 54 Proz. der Theorie.

Blaßgelbe Nädelchen, bei 187° schmelzend, kaum löslich in kaltem, wohl aber leicht in siedendem Wasser, schwer löslich in Alkohol und Äther, löslich in Benzol.

Das gleiche Produkt wurde erhalten, wenn 1,5 g Kreatinin mit 7,0 g Benzoësäureanhydrid 4 Stunden bei 150° gehalten wurden, wobei sich die geschmolzene Masse dunkelgelblichrot färbte und klar wurde. Die Ausbeute betrug hier etwa 39 Proz. Die Identität des Produkts

---

[1]) Liebigs Ann. d. Chem. 284, 49 (1899).

mit dem aus Kreatin erhaltenen ergab sich sowohl aus den äußeren Eigenschaften der reinen Kristalle, als auch aus der Analyse. Sie konnte überdies durch die Mischprobe, bei der das Gemenge beider Substanzen unveränderten Schmelzpunkt zeigte, außer Zweifel gesetzt werden.

In beiden Fällen handelte es sich um Benzoylkreatinin.

	Berechnet für $C_{11}H_{11}N_3O_2$	Gefunden Produkt aus Kreatin		aus Kreatinin
C	60,79	61,06	60,95	61,27
H	5,10	5,34	5,28	5,24
N	19,37	—	18,92	19,45

Einwirkung von Phtalsäureanhydrid.

10 g Phtalsäureanhydrid werden in einem 50 ccm fassenden Erlenmeyerkölbchen im Ölbad zum Schmelzen gebracht, 2,6 g fein gepulvertes Kreatinin eingetragen und das Gemenge 10 Stunden lang bei 140° erhalten. Die erkaltete Schmelze wird im Soxhletapparat mit Äther erschöpft, der Rückstand dreimal aus absolutem Alkohol umkristallisiert.

Ausbeute etwa 35 Proz. der Theorie.

Haarfeine, farblose Nädelchen, die sich leicht in Wasser, wenig in kaltem, gut in kochendem Alkohol, nicht in Äther oder Benzol lösen. Schmelzpunkt 212°.

Dasselbe Produkt wurde in etwa derselben Ausbeute bei gleichem Verfahren aus Kreatinin erhalten. Es erwies sich als Phtalyldikreatin, $C_6H_4(CO.NH.CNH.N[CH_3].CH_2.COOH)_2$.

	Berechnet für $C_{16}H_{20}N_6O_6$	Gefunden Produkt aus Kreatin	aus Kreatinin
C	48,96	49,69	49,38
H	5,14	5,43	5,38
N	21,45	21,44	21,21
O	24,45	—	—

Auffällig ist dabei, daß durch die Einwirkung des Anhydrids aus dem Kreatinin ein Kreatinderivat hervorgeht, obgleich Bedingungen für eine Hydrierung anscheinend nicht gegeben sind.

In den mitgeteilten Versuchen war die Acylierung nicht nachweisbar über die Bildung eines Monoacylprodukts hinausgegangen, im Gegensatz zur Einwirkung von Essigsäureanhydrid, die nach Erlenmeyers oben hervorgehobener Beobachtung, die ich bestätigen kann, vorwiegend zum Diacetylprodukt führt.

Beiträge
zur
Chemischen Physiologie
und
Pathologie

Zeitschrift für die gesamte Biochemie

unter

Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben

von

Franz Hofmeister

o. Professor der physiologischen Chemie an der Universität Straßburg

IX. Band 5. bis 7. Heft

(Ausgegeben Februar 1907)

Braunschweig

Druck und Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn

1907

Inhalt des 5. bis 7. Heftes.

Die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie“ erscheinen in zwanglosen Heften, von denen 12 einen Band von etwa 30 Druckbogen zum Preise von M. 15,— bilden.

Die Ausgabe der Hefte erfolgt nach Maßgabe des einlaufenden Materials in kurzen Zwischenräumen. Die Zahl der in einem Jahre erscheinenden Bände soll zwei nicht überschreiten.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Straßburg i. E., Wimpfelingstraße 2, zu richten.

Bei der Aufnahme von Arbeiten in die „Beiträge“ soll in erster Reihe deren biologisches Interesse, sodann Exaktheit der Durchführung, Sachlichkeit, Knappheit und Übersichtlichkeit der Darstellung maßgebend sein. Polemische Ausführungen, welche den Rahmen einer tatsächlichen Richtigstellung überschreiten, können nicht Aufnahme finden. Der kurzen Mitteilung neuer Befunde bleibt ein besonderer Raum vorbehalten. Solchen „kürzeren Mitteilungen“ kann ein besonders rasches Erscheinen zugesichert werden.

Die Mitarbeiter erhalten ein Honorar von M. 40,— für den Druckbogen und 50 Sonder-Abzüge.

XV.

Untersuchungen über Blutgerinnung.

Von **Leo Loeb**.

Achte Mitteilung.

Aus dem pathologischen Laboratorium der University of Pennsylvania, Philadelphia, und aus dem Marine Biological Laboratory, Woods Holl, Mass.

I. Über das Zeitgesetz der Gewebskoaguline und des Thrombins bei Wirbellosen.

II. Über die Ersetzbarkeit des Calciums durch andere Kationen und über die Wirkungsweise des Calciums.

1. Über das Zeitgesetz der Gewebskoaguline. In einer früheren Mitteilung[1]) gab ich an, daß in dem Hummermuskelextrakt die Blutgerinnung hemmende Substanzen vorhanden sind, und daß bei Zusatz steigender Mengen von Muskelextrakt bis zu einer gewissen Grenze die Gerinnungszeit abnimmt, bei Zusatz von mehr Muskelextrakt aber die Gerinnungszeit wieder verlängert wird. Die Kompliziertheit dieser Verhältnisse war wahrscheinlich durch die Beimischung der gerinnungshemmenden zu den gerinnungsbeschleunigenden Substanzen des Muskelextraktes bedingt.

Es wurden daher Versuche mit Muskelextrakt angestellt, welches etwa 12 bis 20 Stunden (in einigen Versuchen auch weniger) gegen destilliertes Wasser dialysiert worden war. Zur Verhinderung der Fäulnis wurde dem Muskelextrakt und dem destillierten Wasser während der Dialyse Thymol zugesetzt. Das dialysierte Muskelextrakt hatte die gerinnungshemmenden Substanzen zum größten Teile verloren und es ergab sich nun eine direkte Proportionalität zwischen der Menge des zugesetzten Muskel-

---

[1]) Diese Beiträge 6, 260 (1905).

extraktes und der Verkürzung der Gerinnungszeit. Zu diesen Gerinnungsversuchen wurde zweckmäßig unverdünntes Hummerplasma und mit destilliertem Wasser verdünntes Muskelextrakt benutzt, um die Gerinnung massiger und den Gerinnungspunkt schärfer zu machen und um etwa im Muskelextrakt zurückgebliebene störende Substanzen noch weiter zu verdünnen. Als Zeitpunkt der Gerinnung wurde, wie in den früheren Versuchen, das Erscheinen der ersten Fibrinschicht auf dem Boden der Glasschale angenommen; bei größeren Extraktmengen trat die Gerinnung des gesamten Plasmas fast mit einem Schlage ein, und hier mußte also dieser Zeitpunkt als maßgebend angenommen werden. In jedem Versuche wurden die Reagenzien während des Versuches bei derselben Temperatur gehalten. Kleine Variationen der Temperatur konnten nicht in jedem Falle ausgeschlossen werden; auch war der Zeitpunkt des ersten Eintretens der Gerinnung in einzelnen Fällen nur mit wechselnder Schärfe festzustellen. Berücksichtigen wir diese Variabeln, so dürfte die Übereinstimmung der experimentellen Ergebnisse mit den berechneten Zeiten genügend sein, um die direkte Proportionalität zu erweisen. Im folgenden seien einige Versuche angeführt, die als Beispiele für alle Versuche gelten können. Je besser die Versuchsbedingungen waren, desto größer war die Übereinstimmung zwischen berechneter und experimentell gefundener Zeit.

In den einzelnen Versuchen wurde mit destilliertem Wasser auf das gleiche Volumen aufgefüllt. Die Ziffern der letzten Reihe sind das Produkt von Zeit und Extraktmenge.

I.

	Hummerplasma (unverdünnt)	Muskelextrakt (5 fach verdünnt, dialysiert)	Probe			
1.	3 ccm	+ 0,1 ccm	I.	280	Sekunden	(28)
			II.	273	„	(27)
2.	3 „	+ 0,2 „	I.	129	„	(26)
			II.	133	„	(27)
3.	3 „	+ 0,25 „	I.	117	„	(29)
			II.	103	„	(26)
4.	3 „	+ 0,4 „	I.	65	„	(26)
			II.	66	„	(26)
5.	3 „	+ 0,5 „	I.	50	„	(25)
			II.	54	„	(27)
6.	3 „	+ 0,75 „	I.	39	„	(29)
			II.	36	„	(27)
7.	3 „	+ 1 „	I.	29	„	(29)
			II.	28	„	(28)

II.

Hummerplasma (unverdünnt)	Muskelextrakt (5 fach verdünnt, dialysiert)	Probe		
1. 3 ccm	+ 0,1 ccm	459	Sekunden	(46)
2. 3 „	+ 0,2 „	212	„	(42)
3. 3 „	+ 0,25 „	166	„	(42)
4. 3 „	+ 0,4 „	104	„	(42)
5. 3 „	+ 0,5 „	73	„	(37)
6. 3 „	+ 0,75 „	52	„	(39)
7. 3 „	+ 1 „	39	„	(39)

III.

Hummerplasma (unverdünnt)	Muskelextrakt (3 fach verdünnt, dialysiert)	Probe		
1. 3 ccm	+ 0,1 ccm	247	Sekunden	(25)
2. 3 „	+ 0,25 „	87	„	(22)
3. 3 „	+ 0,5 „	45	„	(23)
4. 3 „	+ 0,75 „	30	„	(23)

IV.

Hummerplasma (unverdünnt)	Muskelextrakt (6 fach verdünnt, dialysiert)	Probe		
1. 3 ccm	+ 0,1 ccm	426	Sekunden	(43)
2. 3 „	+ 0,2 „	207	„	(41)
3. 3 „	+ 0,25 „	168	„	(42)
4. 3 „	+ 0,4 „	103	„	(41)
5. 3 „	+ 0,5 „	89	„	(45)
6. 3 „	+ 0,75 „	56	„	(42)
7. 3 „	+ 1 „	43	„	(43)
8. 3 „	+ 1,2 „	39	„	(47)
9. 3 „	+ 1,5 „	33	„	(50)

V.

Hummerplasma (unverdünnt)	Muskelextrakt (3 fach verdünnt, dialysiert)	Probe		
1. 3 ccm	+ 0,1 ccm	181	Sekunden	(18)
2. 3 „	+ 0,2 „	81	„	(16)
3. 3 „	+ 0,25 „	66	„	(16)
4. 3 „	+ 0,4 „	41	„	(16)
5. 3 „	+ 0,5 „	35	„	(18)
6. 3 „	+ 0,75 „	22	„	(17)
7. 3 „	+ 0,8 „	21	„	(17)
8. 3 „	+ 1 „	16	„	(16)

Unter Berücksichtigung der durch die Versuchsanordnung bedingten Ungenauigkeiten beweisen diese und ähnliche andere Versuche die direkte Proportionalität zwischen Menge des Gewebskoagulins und der Gerinnungsbeschleunigung. Bei den Gewebskoagulinen der Wirbel-

tiere konnte eine direkte Proportionalität bisher nicht nachgewiesen werden. Beim Hirudinblut existiert eine Kurve, die viele Ähnlichkeit mit der des nicht dialysierten Hummermuskelextraktes Hummerplasma gegenüber zeigt. Hundenieren- oder Hundeleberextrakt gewinnen Hundehirudinblut gegenüber an Kraft bis zu einem gewissen Optimum der zugesetzten Extraktmenge. Weiterer Zusatz von Extrakt führt zu keiner Beschleunigung, und Zusatz von noch mehr Extrakt verlängert gewöhnlich die Gerinnungszeit[1]). Beim Vogelplasma fand Fuld[2]), daß das Verhältnis von Gerinnungszeit zu Gewebsextraktmenge der Schützschen Regel folgt. Ob nicht auch den Gewebskoagulinen der Wirbeltiere Substanzen beigemischt sind, welche die Gerinnungskurve beeinflussen, wäre noch zu untersuchen.

2. Über den Charakter der im Muskelextrakt vorhandenen gerinnungshemmenden Substanzen. Da die die Blutgerinnung hemmenden Substanzen durch Calcium in ihrer Wirkung großenteils neutralisiert werden, so lag die Annahme nahe, daß es sich hierbei um Phosphate handle; dafür sprach auch die leichte Dialysierbarkeit dieser Substanzen. Dagegen spricht, daß weder mit einbasischem, noch mit zweibasischem Natriumphosphat sich ihre Wirkung genau nachahmen läßt. Aber hierbei dürfte die Reaktionsänderung bei Zusatz dieser Substanzen von Bedeutung sein, und es dürfte sich im Muskelextrakt um Gemische verschiedener Phosphate handeln. Jedenfalls lassen sich im Filtrat des durch Hitze inaktivierten Muskelextraktes reichlich Phosphate nachweisen und es ist bei weitem am wahrscheinlichsten, daß die Phosphate durch Bindung des Calciums die Gerinnung hemmen.

3. Über das Zeitgesetz des Thrombins. Da die im Muskelextrakt vorhandene gerinnungsbeschleunigende Substanz sehr wirksam ist, so brauchen nur relativ kleine Quantitäten zu Versuchen wie die oben beschriebenen benutzt zu werden. Das Verdünnungsmittel spielt daher hierbei nur eine geringe Rolle. Anders verhält es sich mit den im Blutserum vorhandenen gerinnungsbefördernden Substanzen; sie sind weniger wirksam, da sie in größerer Verdünnung vorhanden sind; es müssen daher größere Mengen Blutserum zu solchen Versuchen gebraucht werden und hier spielt das Verdünnungsmittel eine nicht unbeträchtliche Rolle. Während destilliertes Wasser als Verdünnungsmittel für Muskel-

[1]) Hierüber sollen später genauere Mitteilungen gemacht werden.

[2]) E. Fuld, Über das Zeitgesetz des Fibrinferments. Diese Beiträge 2, 514 (1902).

extrakt ziemlich indifferent ist, wirkt, wie wir früher sahen[1]), Verdünnung des Hummerplasmas oder des Serums mit Wasser sehr günstig. Daher wirken kleine Mengen Thrombin (Serum) bei Verdünnung mit Wasser relativ besser als große Mengen. Auf diese Weise ergibt sich eine scheinbare Abweichung von der direkten Proportionalität zwischen Thrombinmenge und Gerinnungsbeschleunigung, wenn Wasser benutzt wird, um zu einem bestimmten Volumen aufzufüllen. Ein ganz indifferentes Verdünnungsmittel steht nicht zur Verfügung; wird inaktiviertes (erhitztes) Serum oder n/2-NaCl benutzt, so kommt es vor, daß die Ausschläge bei größerer Verdünnung in umgekehrter Richtung als bei Verdünnung mit Wasser gehen. Dazu kommt, daß Thrombin viel schneller an Wirksamkeit verliert als Muskelextrakt. Ziehen wir alle diese Faktoren in Betracht, so folgt aus den angestellten Versuchen, daß auch im Falle des Thrombins direkte Proportionalität zwischen der benutzten Fermentmenge und der Gerinnungsbeschleunigung besteht.

Insbesondere ist zu berücksichtigen, daß durch Erwärmen (Inaktivieren) des Serums eine Reihe von nicht unwesentlichen Veränderungen im Serum vor sich gehen, so daß auch erwärmtes Serum nicht als ein indifferentes Verdünnungsmittel betrachtet werden kann. Einige Versuche seien angeführt:

I.

	Hummerplasma	Serum					
1.	2 ccm	+ 2 ccm	I. Probe	5 Min.	45 Sek.	(69)
			II. „	5 „	42 „	(68)
2.	2 „	+ 1,5 „	+ 0,5 ccm H_2O	7 „	18 „	(66)
	2 „	+ 1,5 „	+ 0,5 „ inakt. Serum .	7 „	39 „	(68)
3.	2 „	+ 1 „	+ 1 „ H_2O	8 „	15 „	(50)
	2 „	+ 1 „	+ 1 „ inakt. Serum .	10 „	9 „	(61)
4.	2 „	+ 0,5 „	+ 1,5 „ H_2O	12 „	8 „	(36)
	2 „	+ 0,5 „	+ 1,5 „ inakt. Serum .	21 „	44 „	(65)
5.	2 „	+ 0,25 „	+ 1,75 „ H_2O	24 „	36 „	(37)
	2 „	+ 0,25 „	+ 1,75 „ inakt. Serum .	49 „	20 „	(74)

II.

	Hummerplasma (unverdünnt)	Serum				
1.	2 ccm	+ 2 ccm	I. Probe	4 Min.	57 Sek.	(59)
			II. „	4 „	58 „	(60)
2.	2 „	+ 1,5 „	+ 0,5 ccm H_2O	6 „	4 „	(55)
	2 „	+ 1,5 „	+ 0,5 „ n/2 NaCl . . .	6 „	29 „	(58)
	2 „	+ 1,5 „	+ 0,5 „ inakt. Serum .	6 „	56 „	(62)

[1]) Diese Beiträge l. c. und 8, 67 (1906).

(Fortsetzung von II.)

Hummerplasma (unverdünnt)	Serum			
3. 2 ccm	+ 1 ccm	+ 1 ccm H_2O	7 Min. 51 Sek.	(47)
2 „	+ 1 „	+ 1 „ n/2 NaCl . . .	8 „ 35 „	(52)
2 „	+ 1 „	+ 1 „ inakt. Serum .	8 „ 53 „	(53)
4. 2 „	+ 0,5 „	+ 1,5 „ H_2O	11 „ 47 „	(35)
2 „	+ 0,5 „	+ 1,5 „ n/2 NaCl . . .	16 „ 2 „	(48)
2 „	+ 0,5 „	+ 1,5 „ inakt. Serum .	16 „ 44 „	(51)
5. 2 „	+ 0,25 „	+ 1,75 „ H_2O	22 „ 51 „	(34)
2 „	+ 0,25 „	+ 1,75 „ n/2 NaCl . . .	35 „ 58 „	(54)
2 „	+ 0,25 „	+ 1,75 „ inakt. Serum .	35 „ 55 „	(54)

III.

Hummerplasma (unverdünnt)	Serum			
1. 3 ccm	+ 2 ccm		4 Min. 7 Sek.	(49)
2. 3 „	+ 1,5 „	+ 0,5 ccm H_2O	4 „ 56 „	(44)
3. 3 „	+ 1 „	+ 1 „ H_2O	7 „ 2 „	(42)
4. 3 „	+ 0,5 „	+ 1,5 „ H_2O	14 „ 29 „	(43)
5. 3 „	+ 0,25 „	+ 1,75 „ H_2O	27 „ 17 „	(41)

IV.

Hummerplasma (unverdünnt)	Serum			
1. 3 ccm	+ 0,5 ccm	+ 2,5 ccm H_2O	29 Min. 47 Sek.	(89)
2. 3 „	+ 1 „	+ 2 „ H_2O	14 „ 18 „	(86)
3. 3 „	+ 1,5 „	+ 1,5 „ H_2O	10 „ 50 „	(98)
4. 3 „	+ 2 „	+ 1 „ H_2O	7 „ 35 „	(91)
5. 3 „	+ 2,5 „	+ 0,5 „ H_2O	6 „ 21 „	(95)
6. 3 „	+ 3 „	. . . .	5 „ 21 „	(96)

4. Über die Ersetzbarkeit des Calciums durch andere Kationen. In der vorhergehenden Mitteilung[1]) habe ich gezeigt, daß, wenn man Hummerplasma durch destilliertes Wasser verdünnt, in der Volumeinheit der Flüssigkeit eine Verarmung an Calcium eintritt, und daß infolgedessen die Gewebskoaguline in ihrer Wirkung sehr stark geschwächt werden. Durch Zusatz von Calciumchlorid zu dem verdünnten Plasma kann nun die Gerinnungszeit sehr verkürzt und die Menge des ausgeschiedenen Fibrins stark vermehrt werden. Ähnlich wie Calciumchlorid wirken Stron-

[1]) Untersuchungen über Blutgerinnung, VII. Mitteilung. Diese Beiträge **8**, 67. Hier ist die Wirkung von $MgCl_2$ auf mit H_2O verdünntes Hummerplasma in allem Wesentlichen richtig beschrieben; vgl. S. 76 u. 77, S. 83 u. 93. Doch unterlief auf S. 83, Zeile 16 von unten ein sinnentstellender Schreibfehler. Statt „stärker“ sollte es „weniger stark“ heißen. Eine Modifikation der früheren Mitteilung wäre nur insofern vorzunehmen, als das Optimum des $MgCl_2$-Zusatzes ungefähr mit dem des $CaCl_2$ der Menge nach zusammenfallen kann. Absolut ist aber das Optimum des $MgCl_2$ schlechter als das des $CaCl_2$.

tium-, Baryum- und auch Magnesiumchlorid. Nur wirken diese drei Salze weniger kräftig, insbesondere wirkt das Magnesiumchlorid deutlich weniger günstig als Calciumchlorid. Wird etwas mehr der drei letztgenannten Salze zugesetzt, so daß das Optimum überschritten wird, so tritt hier die hemmende Wirkung sehr deutlich hervor.

Verwendet man aber anstatt mit Wasser verdünnten Hummerplasmas eine Fibrinogenlösung, in der das Fibrinogen zweimal präzipitiert worden war, so gerinnt dieses mit Muskelextrakt nicht, entsprechend dem in den früheren Mitteilungen Gesagten. Durch Zusatz von Calciumchlorid kann nun hier mit Muskelextrakt eine rasche Gerinnung bewirkt werden. An Stelle von $CaCl_2$ kann $SrCl_2$ oder $BaCl_2$ treten, wenngleich diese letzteren weniger günstig wirken als $CaCl_2$. $MgCl_2$ ist aber in diesem Falle wirkungslos in Verbindung mit Muskelextrakt. $MgCl_2$ bewirkt also in Verbindung mit Muskelextrakt Gerinnung des mit Wasser verdünnten Hummerplasmas, nicht aber des zweimal präzipitierten Fibrinogens. Dieser scheinbare Widerspruch erklärt sich in einfacher Weise: Verdünntes Hummerplasma enthält noch ein wenig Calcium, aber nicht genug, um eine kräftige Gerinnung durch Muskelextrakt zu bewirken. Ohne Zusatz von $CaCl_2$ tritt in dem vierfach mit Wasser verdünnten Hummerplasma nur eine verzögerte und sehr spärliche Ausscheidung von Flocken ein. Nach Zusatz von $CaCl_2$ oder, wenn auch weniger gut, von $MgCl_2$ erfolgt eine starke gelatinöse Koagulation in viel kürzerer Zeit. Zweimal präzipitiertes Fibrinogen ist aber Ca-frei oder enthält eine viel geringere Menge Ca als vierfach verdünntes Hummerplasma. Hier ist nun Zusatz von $MgCl_2$ ungenügend. Es ist also offenbar für die Wirkung des Muskelextraktes eine kleine Menge $CaCl_2$ nötig. Diese Menge ist aber nur ein sehr kleiner Bruchteil der optimalen $CaCl_2$-Menge. Sie kann durch $SrCl_2$ und $BaCl_2$ ersetzt werden, nicht aber durch $MgCl_2$. Die bei weitem größere Quantität der optimalen $CaCl_2$-Menge kann hingegen durch $MgCl_2$ ersetzt werden. Im verdünnten Hummerplasma ist die durch $MgCl_2$ nicht vertretbare Menge von $CaCl_2$ schon enthalten; deshalb ist hier bloßer Zusatz von $MgCl_2$ genügend. Das zweimal präzipitierte Fibrinogen enthält aber nicht genug Calcium. Hier müssen wir erst eine sehr geringe Menge Calcium zusetzen und in Verbindung hiermit bewirkt dann wieder Magnesium eine gute Gerinnung. Die zugesetzte minimale Menge $CaCl_2$ ist allein nicht genügend, mit Muskelextrakt eine schnelle und vollkommene Gerinnung des Fibrinogens zu bewirken; sondern Fibrinogen plus der minimalen Ca-Menge verhält sich wie vierfach

verdünntes Hummerplasma, das mit Muskelextrakt allein nur eine geringe und langsame Gerinnung zeigt. Setzen wir aber zu einer solchen Fibrinogenlösung, die z. B. auf 3 ccm 1 bis 2 Tropfen n/10-$CaCl_2$ erhalten hat, 0,25 bis 0,5 n-$MgCl_2$, so tritt eine sehr vollständige Gerinnung ein, während $MgCl_2$, allein dem Fibrinogen zugesetzt, dem Muskelextrakt eine Wirkung nicht ermöglicht. Wie $MgCl_2$ verhält sich nun auch NaCl, mit dem Unterschied jedoch, daß das Optimum für NaCl viel höher liegt als für $MgCl_2$ oder $CaCl_2$, wahrscheinlich entsprechend der Tatsache, daß Na ein einwertiges Kation ist, Mg und Ca aber zweiwertig. Wir müssen also viel größere Mengen NaCl zusetzen als $CaCl_2$ oder $MgCl_2$. Während die optimale Menge $CaCl_2$ und $MgCl_2$ für vierfach verdünntes Hummerplasma (3 ccm) und 0,25 ccm dialysiertes Muskelextrakt etwa 0,75 ccm einer Normallösung beträgt, beträgt sie für NaCl etwa das Doppelte, nämlich ungefähr 1,5 ccm einer Normallösung. Und dann ist das Optimum von NaCl absolut weniger günstig als das von $MgCl_2$ oder $CaCl_2$. Das Optimum von $MgCl_2$ ist absolut immer schlechter als das von $CaCl_2$. Wie schon früher erwähnt, ist auf der anderen Seite die hemmende Wirkung von NaCl, falls es in mehr als optimalen Mengen benutzt wird, geringer als die von $CaCl_2$ und $MgCl_2$. W i r k ö n n e n a l s o z w e i A r t e n v o n C a l c i u m u n t e r s c h e i d e n. D i e e r s t e i s t n u r i n s e h r g e r i n g e n Q u a n t i t ä t e n n ö t i g u n d k a n n n u r d u r c h S t r o n t i u m u n d B a r y u m e r s e t z t w e r d e n. D i e z w e i t e u m f a ß t d i e b e i w e i t e m g r ö ß e r e Q u a n t i t ä t d e r o p t i m a l e n C a l c i u m m e n g e. D i e s e s l e t z t e r e C a l c i u m k a n n n i c h t n u r d u r c h S r u n d B a, s o n d e r n a u c h d u r c h M g, N a u n d v e r m u t l i c h d u r c h K a t i o n e n i m a l l g e m e i n e n v e r t r e t e n w e r d e n, falls diese Kationen nicht anderweitig schädliche Nebenwirkungen ausüben, wie dies die Schwermetalle tun.

Verwendet man an Stelle von zweimal präzipitiertem Fibrinogen durch einmalige Fällung erhaltenes Fibrinogen, so kann es vorkommen, daß eine solche Fibrinogenlösung sich wie vierfach verdünntes Hummerplasma verhält, was darauf beruht, daß eine solche Fibrinogenlösung noch genügend Calcium enthält, um dem $MgCl_2$ und vielleicht sogar dem NaCl die Wirkung in Verbindung mit Muskelextrakt zu ermöglichen.

I.

1. 3 ccm zweimal gefälltes Fibrinogen + 2 Tropfen n/40-$CaCl_2$ + 0,25 ccm H_2O + 0,25 ccm Muskelextrakt. Koagulation nach $2^1/_2$ Stunden noch nicht begonnen.

2. 3 ccm zweimal gefälltes Fibrinogen + 2 Tropfen n/40-$CaCl_2$ + 0,25 ccm n-$MgCl_2$ + 0,25 ccm Muskelextrakt. Koagulation nach $2^1/_2$ Stunden noch nicht begonnen.
3. 3 ccm zweimal gefälltes Fibrinogen + 1 Tropfen n/10-$CaCl_2$ + 0,25 ccm H_2O + 0,25 ccm Muskelextrakt. Koagulation nach $2^1/_2$ Stunden noch nicht begonnen.
4. 3 ccm zweimal gefälltes Fibrinogen + 1 Tropfen n/10-$CaCl_2$ + 0,25 ccm n-$MgCl_2$ + 0,25 ccm Muskelextrakt. Koagulation nach $2^1/_2$ Stunden noch nicht begonnen.
5. 3 ccm zweimal gefälltes Fibrinogen + 3 Tropfen n/10-$CaCl_2$ + 0,25 ccm H_2O + 0,25 ccm Muskelextrakt. Nach 1 Stunde sehr kleine Flocken.
6. 3 ccm zweimal gefälltes Fibrinogen + 3 Tropfen n/10-$CaCl_2$ + 0,25 ccm n-$MgCl_2$ + 0,25 ccm Muskelextrakt. Nach 3 Min. 37 Sek. koaguliert.
7. 3 ccm zweimal gefälltes Fibrinogen + 5 Tropfen n/10-$CaCl_2$ + 0,25 ccm H_2O + 0,25 ccm Muskelextrakt. Nach 7 Min. 48 Sek. kleine Flocken. Nach 2 Stunden kleines Koagulum.
8. 3 ccm zweimal gefälltes Fibrinogen + 5 Tropfen n/10-$CaCl_2$ + 0,25 ccm n-$MgCl_2$ + 0,25 ccm Muskelextrakt. Nach 1 Min. 14 Sek. gelatinöses Koagulum.
9. 3 ccm zweimal gefälltes Fibrinogen + 3 Tropfen n/10-$CaCl_2$ + 1 ccm H_2O + 0,25 ccm Muskelextrakt. Kleines Koagulum nach $1^1/_2$ Stunden.
10. 3 ccm zweimal gefälltes Fibrinogen + 3 Tropfen n/10-$CaCl_1$ + 1 ccm n-NaCl + 0,25 ccm Muskelextrakt. Nach 12 Min. 54 Sek. koaguliert. (Das Muskelextrakt war in diesem Falle dialysiert gewesen.)

II.

1. 3 ccm zweimal gefälltes Fibrinogen + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert). Nach 3 Stunden noch keine Koagulation.
2. 3 ccm zweimal gefälltes Fibrinogen + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert) + 0,25 ccm n-$CaCl_2$. Nach 31 Sekunden festes Koagulum.
3. 3 ccm zweimal gefälltes Fibrinogen + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert) + 0,5 ccm n-$CaCl_2$. Nach 33 Sekunden festes Koagulum.
4. 3 ccm zweimal gefälltes Fibrinogen + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert) + 0,25 ccm n-$SrCl_2$. Nach 55 Sekunden festes Koagulum.
5. 3 ccm zweimal gefälltes Fibrinogen + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert) + 0,5 ccm n-$SrCl_2$. Nach 42 Sekunden festes Koagulum.
6. 3 ccm zweimal gefälltes Fibrinogen + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert) + 0,25 ccm n-$BaCl_2$. Nach 1 Minute 18 Sekunden festes Koagulum.
7. 3 ccm zweimal gefälltes Fibrinogen + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert) + 0,5 ccm n-$BaCl_2$. Nach 1 Minute 4 Sekunden festes Koagulum.
8. 3 ccm zweimal gefälltes Fibrinogen + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert) + 0,25 ccm n-$MgCl_2$. Nach 3 Stunden nicht koaguliert.
9. 3 ccm zweimal gefälltes Fibrinogen + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert) + 0,5 ccm n-$MgCl_2$. Nach 3 Stunden noch nicht koaguliert.

Aus den folgenden beiden Versuchen geht hervor, daß das Optimum des n-$NaCl_2$-Zusatzes etwa bei 1,50 ccm liegt, während bei diesem Zusatz n-$CaCl_2$ und n-$MgCl_2$ ihr Optimum bereits überschritten haben. Aus anderen hier nicht mitgeteilten Versuchen

geht hervor, daß das Optimum des $MgCl_2$- und $CaCl_2$-Zusatzes bei 0,5 bis 0,75 ccm einer n-Lösung liegt.

III.

1. 3 ccm Hummerplasma (vierfach verd.) + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert, unverd.) + 0,75 ccm n-NaCl. Nach 1 Min. 30 Sek. gelat. Koagulum.
2. 3 ccm Hummerplasma (vierfach verd.) + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert, unverd.) + 0,75 ccm n-$MgCl_2$. Nach 44 Sek. gelat. Koagulum.
3. 3 ccm Hummerplasma (vierfach verd.) + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert, unverd.) + 0,75 ccm n-$CaCl_2$. Nach 22 Sek. gelat. Koagulum.
4. 3 ccm Hummerplasma (vierfach verd.) + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert, unverd.) + 1 ccm n-NaCl. Nach 1 Min. 13 Sek. gelat. Koagulum.
5. 3 ccm Hummerplasma (vierfach verd.) + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert, unverd.) + 1 ccm n-$MgCl_2$. Nach 1 Min. 30 Sek. loses, gelat. Koagulum.
6. 3 ccm Hummerplasma (vierfach verd.) + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert, unverd.) + 1 ccm n-$CaCl_2$. Nach 40 Sek. gelat. Koagulum.
7. 3 ccm Hummerplasma (vierfach verd.) + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert, unverd.) + 1,25 ccm n-NaCl. Nach 1 Min. 5 Sek. gelat. Koagulum.
8. 3 ccm Hummerplasma (vierfach verd.) + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert, unverd.) + 1,25 ccm n-$MgCl_2$. Nach 5 Min. 50 Sek. koaguliert.
9. 3 ccm Hummerplasma (vierfach verd.) + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert, unverd.) + 1,25 ccm n-$CaCl_2$. Nach 1 Min. 26 Sek. koaguliert.

IV.

1. 3 ccm Hummerplasma (vierfach verd.) + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert, unverd.) + 0,75 ccm n-NaCl. Nach 3 Min. 43 Sek. kleines gelat. Koagulum.
2. 3 ccm Hummerplasma (vierfach verd.) + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert, unverd.) + 1 ccm n-NaCl. Nach 2 Min. 33 Sek. gelat. Koagulum.
3. 3 ccm Hummerplasma (vierfach verd.) + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert, unverd.) + 1,25 ccm n-NaCl. Nach 2 Min. 2 Sek. gelat. Koagulum.
4. 3 ccm Hummerplasma (vierfach verd.) + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert, unverd.) + 1,5 ccm n-NaCl. Nach 1 Min. 51 Sek. gelat. Koagulum.
5. 3 ccm Hummerplasma (vierfach verd.) + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert, unverd.) + 2 ccm n-NaCl. Nach 2 Min. 54 Sek. koaguliert.

5. Wie verhalten sich dialysiertes Muskelextrakt und dialysierte Thrombinlösungen gegen Calciumentziehung?

Aus den oben angeführten und anderen ähnlichen Versuchen folgt auch, daß dialysiertes Muskelextrakt, aus dem die die Gerinnung hemmende, Calcium bindende Substanz zum größten Teile entfernt wurde, ebensosehr des Calciums bedarf, um die Gerinnung des Hummerplasmas herbeizuführen, wie undialysiertes Muskelextrakt. Auch ist das Optimum des Calciumzusatzes für dialysiertes und nicht dialysiertes Muskelextrakt ungefähr das gleiche. Also die Gewebekoaguline als solche bedürfen des Calciums, um die Ge-

rinnung des Hummerplasmas herbeizuführen. Umgekehrt bleibt thrombinhaltiges Hummerserum auch nach ein- bis zweistündiger Dialyse gegen destilliertes Wasser und bei Gebrauch von zweimal gefälltem und dann wieder gelöstem Fibrinogen vollständig wirksam, obwohl die hier anwesende Quantität von Calcium nur äußerst gering sein kann. Sogar wenn man einem solchen Gemisch 1 ccm der calciumbindenden, die Gerinnung hemmenden Substanz des Muskelextraktes zusetzt, ist die dialysierte Thrombinlösung noch recht wirksam, obwohl das an und für sich sehr empfindliche Thrombin durch die Dialyse, auch wenn sie bei sehr niedriger Temperatur stattfindet, etwas geschädigt wird. Also wie bei den entsprechenden Stoffen der Wirbeltiere ist Gewebskoagulin an und für sich auf eine gewisse Menge Calcium angewiesen und Thrombin ist in weiten Grenzen unabhängig von Calcium. Setzt man zu einer zweimal gefällten Fibrinogenlösung eine kleine Menge $CaCl_2$, so kann eine ganz geringfügige Beschleunigung der Gerinnung, welche durch Thrombin bewirkt wird, stattfinden. Umgekehrt enthält, wie schon in einer früheren Mitteilung hervorgehoben, das unverdünnte Hummerplasma alles für die Gewebskoaguline nötige Calciumchlorid, und Zusatz von $CaCl_2$ zu dem unverdünnten Hummerplasma hemmt die Wirkung des Muskelextraktes ein wenig. Aber Zusatz von mehr als der optimalen Quantität $CaCl_2$ ist unverdünntem Hummerplasma gegenüber weniger schädlich, als wenn die gleiche Menge $CaCl_2$ oder $MgCl_2$ über das Optimum hinaus in vierfach verdünntem Hummerplasma zugesetzt wird.

Wir finden ferner, daß auch dialysiertes Hummermuskelextrakt zweimal präzipitiertes und wieder gelöstes Fibrinogen mit dem nötigen $CaCl_2$-Zusatz sehr schnell zur Gerinnung bringt. Ca + Gewebskoagulin genügen vollkommen, die Gerinnung des Fibrinogens zu bewirken und eine Fibrinogenlösung verhält sich im wesentlichen wie Hummerplasma, dem Calcium und andere zweiwertige Kationen entzogen wurden (andere Salze kommen weniger in Betracht).

6. In bezug auf die Darstellung des Fibrinogens erwies es sich als zweckmäßiger, anstatt wie früher, das Hummerblut direkt vom Tiere in einem großen Überschuß von gesättigter Kochsalzlösung aufzufangen, unverdünntes Plasma wie gewöhnlich zu bereiten, es zu erwärmen, um es beständig zu machen, und dann dazu Kochsalz in Substanz zuzufügen. Sodann wird filtriert, der Filterrückstand in destilliertem Wasser aufgelöst, nochmals mit Kochsalz in Substanz gefällt, wieder abfiltriert und der Rück-

stand in Wasser aufgenommen. Ein drittes Mal kann dieser Prozeß nicht wiederholt werden, da der Verlust an Fibrinogen zu groß ist. Doch gibt diese Modifikation der früher angegebenen Methode eine bessere Ausbeute und ist viel bequemer.

7. Über die Gerinnungszeit nach Zusatz steigender Mengen der hemmenden Substanz des Muskelextrakts.

Wir haben oben gesehen, daß wir je nach der Ersetzbarkeit durch Magnesium zwei Arten von Calcium bei der Blutgerinnung unterscheiden können. Zu ähnlichen Schlußfolgerungen werden wir geführt, wenn wir die Kurve betrachten, welche sich ergibt, wenn wir die Mengen hemmender Substanz des Muskelextraktes, die wir dem Hummerplasma + dialysiertem Muskelextrakt zusetzen, auf die Abszisse auftragen, und wenn die Ordinaten die zugehörigen Gerinnungszeiten angeben. Es ergibt sich dann, daß mit steigendem Zusatz der hemmenden Substanz die Gerinnungszeiten erst nur ganz wenig zunehmen, dann werden die Gerinnungszeiten bei weiterem Zusatz der hemmenden Substanz immer größer. Je weniger Calcium noch frei ist, von desto größerem Einfluß ist die weitere Bindung von Calcium durch die hemmende Substanz.

I[1]).

	Hummerplasma (unverdünnt)	Muskelextrakt (dialysiert)	Hemmende Substanz	
1.	3 ccm	+ 0,25 ccm	+ 0,1 ccm	1 Min. 6 Sek.
2.	3 „	+ 0,25 „	+ 0,2 „	1 „ 12 „
3.	3 „	+ 0,25 „	+ 0,25 „	1 „ 15 „
4.	3 „	+ 0,25 „	+ 0,4 „	1 „ 53 „
5.	3 „	+ 0,25 „	+ 0,5 „	2 „ 21 „
6.	3 „	+ 0,25 „	+ 0,75 „	4 „ 56 „
7.	3 „	+ 0,25 „	+ 0,8 „	6 „ 5 „
8.	3 „	+ 0,25 „	+ 1 „	11 „ 13 „
9.	3 „	+ 0,25 „	+ 1,5 „	56 „
10.	3 „	+ 0,25 „	+ 2 „	Noch nicht koaguliert nach 17 Stunden.

Benutzt man zu einem Versuch Flüssigkeiten, die weniger Calcium enthalten als unverdünntes Hummerplasma, so macht sich natürlich die Wirkung der Ca bindenden Substanzen schon bei kleinerem Zusatz geltend.

Diese und ähnliche Versuche zeigen, daß gewisse geringe Mengen von Calcium eine größere Bedeutung für die Gerinnung besitzen als der Rest des Calciums, es nimmt

[1]) In allen Versuchen wurde, wenn nicht besonders das Gegenteil gesagt wird, auf das gleiche Volumen aufgefüllt.

der Wert des zurückbleibenden Calciums stetig zu; es findet jedoch kein plötzlicher Sprung in der Kurve statt. Dieser und ähnliche andere Versuche geben keinen direkten Hinweis darauf, daß zwei verschiedene Arten von Calcium vorliegen, wenn sie auch einer solchen Annahme nicht direkt widersprechen.

8. Weitere Versuche über die Bedeutung des Calciums. Schon in der vorhergehenden Mitteilung haben wir über Versuche berichtet, welche beweisen, daß Calcium in der Hauptsache gleichzeitig mit dem Muskelextrakt wirkt und daß, wenn erst Muskelextrakt allein auf verdünntes Hummerplasma wirkt, und zwar lange genug, um Gerinnung herbeizuführen, falls gleichzeitig $CaCl_2$ zugesetzt worden wäre (was aber in diesem Versuche nicht geschah), und wenn sodann Hummerplasma + Muskelextrakt schnell so stark erwärmt wird, daß das Muskelextrakt seine Wirksamkeit verliert, daß dann nachträglicher Zusatz von $CaCl_2$ höchstens eine ganz geringe Flockenbildung herbeiführt. Falls wir aber zu dem erwärmten Gemisch von Hummerplasma und Muskelextrakt nachträglich Muskelextrakt und Calciumchlorid zusetzen, findet eine viel stärkere Gerinnung statt; die letztere ist allerdings nun nicht mehr so stark, wie sie in dem unbehandelten Hummerplasma gewesen wäre.

Diese Versuche wurden mehrfach mit dialysiertem Muskelextrakt wiederholt und zwar mit dem gleichen Ergebnis. Zuweilen kann sogar die Flockenbildung auf den nachträglichen Zusatz von $CaCl_2$ zu dem erwärmten Gemisch von Plasma und Muskelextrakt ausbleiben. Jedenfalls folgt aus diesen Versuchen, daß zum mindesten der größte Teil des $CaCl_2$ gleichzeitig mit dem Muskelextrakt wirken muß.

Auf Grund der bisher mitgeteilten Befunde können wir uns nun zweierlei Vorstellungen über die Funktion des Calciums bilden. 1. Wir können annehmen, daß das durch Magnesium und andere Kationen nicht ersetzbare Calcium eine andere Funktion hat, als die größte Menge der optimalen Calciummenge. Die nächstliegende Annahme wäre dann die, daß das erstere Calcium in besondere Beziehungen zum Gewebskoagulin tritt, etwa eine chemische Bindung eingeht, in welcher es nur durch Baryum und Strontium vertreten werden kann. Die bei weitem größte Menge des Calciums hingegen hat eine andere Funktion, und hier wäre die nächstliegende Annahme, daß die Salze die Fällung des Fibrinogens direkt erleichtern, in ähnlicher Weise wie auch andere Eiweißstoffe durch Salze oder ihre Ionen gefällt werden. Die Salze

würden dann gleichzeitig mit dem Gewebskoagulin auf das Fibrinogen einwirken und es dem ersteren erleichtern, seine Wirkung auf das Fibrinogen auszuüben. 2. Es ist nicht sicher, daß den zwei Arten von Calcium zwei verschiedene Funktionen entsprechen. Es könnte sich um eine einheitliche Funktion handeln. Eine geringe Menge Calcium ist durchaus nötig; je mehr Calcium dann weiter zugefügt wird, desto geringer wird seine Bedeutung.

Die erstere Annahme ist die wahrscheinlichere, da durch sie die Verschiedenheit in der Ersetzbarkeit des Calciums besser erklärt wird. Für diese Annahme spricht auch die Tatsache, daß, wenn man das Zeitgesetz des Gewebskoagulins gegenüber einer Fibrinogenlösung anstatt gegenüber einer Blutplasmalösung prüft, eine direkte Proportionalität zwischen der Gerinnungsbeschleunigung und Quantität der Gewebskoaguline nicht oder nur bei kleineren Mengen Muskelextraktes nachgewiesen werden kann. Setzt man mehr Muskelextrakt hinzu, so findet keine weitere Gerinnungsbeschleunigung statt. Der Grund liegt offenbar darin, daß eine Fibrinogenlösung für geringe Mengen Muskelextrakt genug Calcium enthält, nicht aber für größere Mengen Muskelextrakt, so daß der Überschuß an Muskelextrakt nicht in Wirksamkeit treten kann. Es handelt sich hierbei um eine relativ konzentrierte, nur einmal gefällte Fibrinogenlösung, die noch eine gewisse Menge Calcium enthält, so daß eine allerdings sehr langsame Gerinnung mit Muskelextrakt eintritt.

Fibrinogenlösung	Muskelextrakt (dialysiert)	
1. 3 ccm	+ 0,25 ccm	17 Min. 9 Sek.
2. 3 „	+ 0,5 „	8 „ 50 „
3. 3 „	+ 1 „	8 „ 15 „

Eine direkte Beziehung zwischen Muskelextrakt (Gewebskoagulin) und Calcium wurde schon in der vorhergehenden Mitteilung in der Weise geprüft, daß das Optimum des Calciumchloridzusatzes für verschiedene Mengen von Muskelextrakt und gleiche Mengen von Hummerplasma bestimmt wurde. Es ergab sich keine bestimmte Beziehung zwischen beiden. Es wurde nun derselbe Versuch mit doppelt gefälltem Fibrinogen und mit dialysiertem Muskelextrakt wiederholt. 0,25 und 0,75 ccm Muskelextrakt wurden in bezug auf ihr Calciumoptimum verglichen. Es ergab sich, daß eine direkte Beziehung derart, daß dreimal mehr $CaCl_2$ für 0,75 ccm Muskelextrakt nötig ist, als für 0,25 ccm Muskelextrakt, nicht besteht. Das $CaCl_2$-Optimum liegt ein wenig höher für

0,75 ccm Muskelextrakt, aber der Unterschied ist nicht bedeutend. Der Hauptunterschied der Kurve für 0,75 ccm Muskelextrakt im Vergleich zu der mit 0,25 ccm Muskelextrakt liegt darin, daß die erstere Kurve flacher ist, insofern als sie bei stärkerem Zusatz von $CaCl_2$ sich länger nahe dem optimalen Gipfel hält, während bei 0,25 ccm Muskelextrakt die Kurve steiler abfällt. Absolut ist das Optimum bei Zusatz von 0,75 ccm Muskelextrakt besser als bei Zusatz von 0,25 ccm Muskelextrakt.

Auf diese Weise läßt sich also eine bestimmte quantitative Beziehung zwischen Gewebskoagulin und Calciumchlorid nicht nachweisen. Dies steht aber nach den oben mitgeteilten Versuchen zu erwarten, da wir gesehen haben, daß die bei weitem größte Menge des Calciumchlorids nicht in direkte chemische Beziehung zu dem Muskelextrakt tritt, sondern durch verschiedenartige Chloride anderer Kationen ersetzt werden kann.

$CaCl_2$, $SrCl_2$, $BaCl_2$ und $MgCl_2$ üben in Verbindung mit Muskelextrakt ihre gerinnungsbeschleunigende Wirkung auf mit Wasser verdünntes Hummerplasma nur dann aus, wenn die Salze dem Hummerplasma zugesetzt werden. Mischt man erst Muskelextrakt und die genannten Salze (etwa in der Proportion von 2 ccm mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnten Muskelextraktes zu 0,25 ccm einer n-Salzlösung), so bildet sich ein flockiger Niederschlag; dies findet in jedem Falle statt mit $CaCl_2$, $SrCl_2$ und $BaCl_2$. Bei diesem Niederschlag handelt es sich im wesentlichen um präzipitiertes Eiweiß. Mit $MgCl_2$ bildet sich kein oder nur ein sehr geringfügiges Präzipitat. War dem Muskelextrakt, wie das während der Dialyse gewöhnlich geschah, etwas Thymol zugesetzt worden, so bildete sich auch mit $MgCl_2$ ein reichlicher Niederschlag. Das beruht offenbar darauf, daß Thymol selbst schon in dem Muskelextrakt eine geringe präzipitierende Wirkung ausübt; auf solches durch Thymol präpariertes Muskelextrakt kann nun auch $MgCl_2$ präzipitierend wirken, während es auf gewöhnliches Muskelextrakt gar nicht oder nur geringfügig präzipitierend wirkt. n-NaCl wirkt nicht ausflockend auf Muskelextrakt. M u s k e l e x t r a k t, d e m n u n d i e s e S a l z e v o r d e r M i s c h u n g m i t H u m m e r p l a s m a z u g e s e t z t w o r d e n w a r e n, h a t b e d e u t e n d a n g e r i n n u n g e r z e u g e n d e r K r a f t H u m m e r p l a s m a g e g e n ü b e r v e r l o r e n. Solches Muskelextrakt wirkt vierfach verdünntem Hummerplasma gegenüber überhaupt nicht, weder Präzipitat noch überstehende Flüssigkeit, während, wenn Muskelextrakt und Salz in denselben Proportionen einzeln dem Hummerplasma zugefügt

werden, eine schnelle Gerinnung eintritt. Verwendet man unverdünntes Hummerplasma, so tritt die Gerinnung viel später ein, als bei getrenntem Zusatz von Muskelextrakt und Salz. Also läßt sich ein Hinweis darauf, daß Muskelextrakt und Calcium eine chemische Bindung eingehen, und daß diese Verbindung die wirksame Substanz darstellt, auf diese Weise nicht gewinnen. Aber auch in diesem Falle muß wieder berücksichtigt werden, daß die Quantität Calcium, die sich mit dem Gewebskoagulin verbindet, nur sehr geringfügig sein kann.

9. In der vorhergehenden Mitteilung wurde angegeben, daß durch die Mischung von Gewebskoagulin (Muskelextrakt) und Serum keine Beschleunigung der Gerinnung herbeigeführt wurde, die nicht ebensogut durch einen Zusatz einer sehr geringen Menge $CaCl_2$ zu Muskelextrakt bewirkt werden kann. Es war nun hierbei der Einwand möglich, daß im Muskelextrakt störende Substanzen enthalten sind, die vielleicht einen spezifischen Einfluß von Muskelextrakt auf Serum oder umgekehrt hemmten. Es wurden deshalb Versuche mit dialysiertem Muskelextrakt angestellt. Es ergab sich nun hier, daß bei Vermischung von Muskelextrakt und frischem Serum eine Gerinnungsbeschleunigung eintritt. Inaktiviert man das Serum vollständig durch Erwärmen auf 52° (20 Minuten) oder auf 56°, so bleibt die Gerinnungsbeschleunigung bestehen, oder jedenfalls ist eine etwa stattfindende Änderung geringfügig. In beiden Fällen ist jedoch die Gerinnungsbeschleunigung bedeutend geringer als die durch den optimalen $CaCl_2$-Zusatz zu Muskelextrakt erzielbare.

Dialysieren wir nun das Serum anderthalb bis zwei Stunden gegen einen großen Überschuß von destilliertem Wasser, so geht die beschleunigende Kraft des Serums ganz oder fast ganz verloren; Zusatz von dialysiertem Serum zu Muskelextrakt wirkt kaum besser als Zusatz von Wasser. Dieses wird nun nicht verursacht durch den schädlichen Einfluß der Dialyse auf das Thrombin, da ja durch Wärme gänzlich inaktiviertes Serum in Verbindung mit Muskelextrakt ebenso günstig oder fast ebenso günstig wirkt wie frisches Serum. Ferner ist nach kurzem Dialysieren der Thrombinverlust relativ geringer als die Abnahme an begünstigendem Einfluß, den Serum auf Muskelextrakt ausübt. Die beschleunigende Wirkung des Serums beruht also auf der Gegenwart eines leicht dialysierbaren Körpers. Es liegt am nächsten, an Kationen, wie Ca, Mg und Na zu denken, die durch Dialyse

entfernt werden. Prothrombin dürfte wohl ebenso wie Thrombin nicht zu den schnell dialysierbaren Körpern gehören, und es ist durchaus unwahrscheinlich, daß die Vorstufe des Thrombins der schnell diffundierbare Körper ist. Dies kann aber auch deswegen mit Sicherheit ausgeschlossen werden, weil auch mit dialysiertem Muskelextrakt eine Bestätigung der früher mit undialysiertem Muskelextrakt angestellten Versuche erzielt wurde, indem sich nämlich ergab, daß bei der unter dem Einfluß des Muskelextraktes stattfindenden Gerinnung des Hummerplasmas, auch unter den hierzu günstigsten Bedingungen, kein Thrombin entsteht, während Thrombin in solchen Filtraten nachgewiesen werden kann, die aus einem unter dem Einfluß frischen Serums geronnenen Hummerplasma erhalten werden.

Es sei nun hier auf eine andere Tatsache hingewiesen, die deswegen von besonderem Interesse ist, weil sich beim Säugetierblut ähnliche Verhältnisse in viel stärker ausgesprochenem Maße finden. Wenn wir nach Mischung von Serum und Muskelextrakt, die Mischung fünf bis sieben Minuten bei Zimmertemperatur stehen lassen, bevor wir das Hummerplasma zusetzen, so findet ein Verlust von 100 Proz. oder mehr an gerinnungsbeschleunigender Kraft statt im Vergleich zu der Mischung, die sofort dem Hummerplasma zugesetzt wird. Dies gilt für frisches und für durch Wärme inaktiviertes Serum. Benutzt man dialysiertes Serum, so ist der Unterschied in der gerinnungserzeugenden Kraft der Mischung bei sofortigem und bei späterem Zusatz zu Hummerplasma sehr gering. Es handelt sich wahrscheinlich um Veränderungen, die in dem Muskelextrakt durch dialysierbare Substanzen des Serums herbeigeführt werden. Es ist dabei zu bemerken, daß die Mischung, die fünf Minuten lang bei Zimmertemperatur stand, bevor sie dem Plasma zugesetzt wurde, eine verzögerte Gerinnung veranlaßt; die Menge des im ganzen ausgeschiedenen Koagulums ist aber gerade so groß, wie bei sofortigem Zusatz der Mischung zum Hummerplasma [1]).

---

[1]) Wie ich früher für Peptonplasma des Hundes fand, übt das Serum des Hundes auch auf die unter dem Einfluß der Gewebskoaguline stattfindende Gerinnung des Hirudinplasmas des Hundes eine stark hemmende Wirkung aus. Bisherige Versuche deuten nun darauf hin, daß diese Wirkung des Hundeserums eine spezifische ist, ebenso wie ich das im Falle des Peptonplasmas fand, und ferner, daß der Zeitpunkt, wann die Mischung von Serum und Gewebsextrakt dem Plasma zugesetzt wird, von großer Bedeutung ist. Bei sofortigem Zusatz zum Plasma scheint der Zusatz von Serum die Wirkung des Muskelextraktes etwas zu

1. 3 ccm Fibrinogen (einmal gefällt) + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert) + 0,5 ccm frisches Serum. Gerinnung nach 1 Min. 23 Sek.
2. 3 ccm Fibrinogen (einmal gefällt) + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert) + 1 ccm frisches Serum. Gerinnung nach 44 Sek.
3. 3 ccm Fibrinogen (einmal gefällt) + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert) + 0,5 ccm altes Serum (dialysiert). Gerinnung nach 12 Min. 21 Sek.
4. 3 ccm Fibrinogen (einmal gefällt) + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert) + 1 ccm altes Serum (dialysiert). Gerinnung nach 10 Min. 48 Sek.
5. 3 ccm Fibrinogen (einmal gefällt) + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert) + 0,5 ccm altes Serum (inaktiviert durch Wärme). Gerinnung nach 1 Min. 27 Sek.
6. 3 ccm Fibrinogen (einmal gefällt) + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert) + 1 ccm altes Serum (inaktiviert durch Wärme). Gerinnung nach 49 Sek.
7. 3 ccm Fibrinogen (einmal gefällt) + 0,25 ccm Muskelextrakt (dialysiert) + 0,5 ccm altes Serum (inaktiviert durch Wärme). Serum und Muskelextrakt blieben nach der Mischung 7½ Minute stehen. Gerinnung 3 Min. 28 Sek. nach Zusatz des Fibrinogens.

10. Wir sehen also, daß in Bestätigung unserer früheren Befunde die neuen Versuche zeigen, daß thrombinhaltiges Serum und gewebskoagulinhaltiges Muskelextrakt, beide unabhängig voneinander, die Gerinnung bewirken, jede dieser beiden Substanzen unter den für sie charakteristischen Bedingungen. Dem entspricht nun auch die Tatsache, daß, wenn wir Hummerblut in einer Schale in Eiswasser halten, und wenn unter diesen Umständen, wie früher angegeben, das überstehende Blutplasma kein oder nur sehr wenig Thrombin enthält, dieses Plasma dennoch auf Zusatz von Muskelextrakt bei Zimmertemperatur außerordentlich schnell gerinnt. Es enthält also alle Bedingungen für die durch Gewebskoagulin veranlaßte Gerinnung in sich, obwohl der für die Thrombinbildung nötige Stoff die Zellen nicht oder nur in geringer Menge verlassen hat.

11. Aus den früheren Untersuchungen ergab sich, daß die im Muskelextrakt vorhandenen, die Gerinnung hemmenden Substanzen im wesentlichen auf Gewebskoaguline hemmend wirken, indem sie das nötige Ca binden und nur schwach hemmend auf Thrombin wirken. Wir haben so ein Mittel, zu bestimmen, ob die aus den Blutzellen nach der Blutentnahme in das Blutplasma übertretenden Substanzen Thrombin oder Prothrombin, oder ob es Gewebskoaguline sind, die in Verbindung mit einem im Blutplasma vorgebildeten Prothrombin oder Thrombogen Thrombin

---

erhöhen, nach fünf bis zehn Minuten langem Stehen der Mischung hat diese außerordentlich an Kraft verloren. Hierüber sollen noch weitere Versuche angestellt werden und es soll in einer späteren Mitteilung darüber ausführlicher berichtet werden.

bilden. Es wurden daher ungefähr 3 ccm Blut in 1, 2 und 3 ccm hemmender Substanz und zur Kontrolle in Wasser aufgefangen. Es ergab sich, daß trotz relativ großer Mengen hemmender Substanz die Gerinnung nur wenig verzögert wurde. Das Resultat war das gleiche in einer Anzahl von Versuchen. Während die in dem vorigen Abschnitt (Nr. 10) mitgeteilten Ergebnisse noch für sich betrachtet die Deutung zugelassen hätten, daß das Thrombogen im Plasma vorgebildet ist und nach der Gerinnung aus den Blutzellen Gewebskoagulin, welches als Kinase wirkt, in das Plasma diffundiert, beweisen diese letzten Versuche, daß eine solche Möglichkeit ausgeschlossen ist, und es bleibt nur die Schlußfolgerung, die auch mit allen anderen Ergebnissen stimmt, daß Gewebskoaguline ganz unabhängig von Thrombin oder einer Vorstufe des Thrombins die Gerinnung bewirken.

Dies gilt für Wirbellose. Ohne hier die Frage zu erörtern, ob bei Wirbeltierblut die Verhältnisse trotz aller scheinbaren Ähnlichkeit so ganz verschieden liegen, so ist jedenfalls aus den hier mitgeteilten Versuchen mit Sicherheit zu schließen, daß die Tatsachen es nicht zulassen, die verschiedensten fermentativen Prozesse auf das für die Enterokinase angenommene Schema zurückzuführen.

Einige Ergebnisse seien zum Schluß zusammengestellt.

1. Beim Blut der Wirbellosen besteht eine direkte Proportionalität zwischen der Menge der Gewebskoaguline und der Gerinnungsbeschleunigung. Es ergibt sich dies aus Versuchen mit dialysiertem Muskelextrakt.

2. Es besteht direkte Proportionalität zwischen der Gerinnungsbeschleunigung und der Menge des Thrombins innerhalb der durch die Versuchsbedingungen gegebenen Genauigkeit. Die wesentliche Abweichung war dadurch bedingt, daß es nicht möglich war, ein indifferentes Verdünnungsmittel des Serums zu erhalten.

3. In der für die unter dem Einflusse der Gewebskoaguline stattfindenden Gerinnung optimalen Ca-Menge sind zwei verschiedene Arten von Ca enthalten: a) eine sehr geringe Quantität Ca, welche nur durch Sr und Ba, nicht aber durch Mg ersetzt werden kann; b) die bei weitem größere Menge Ca, welche durch Ba, Sr, Mg, Na und wahrscheinlich durch andere Kationen ersetzt werden kann.

4. Gewisse Abweichungen von dem oben angegebenen Zeitgesetz des Gewebskoagulins weisen darauf hin, daß Beziehungen

bestehen zwischen der Menge des nötigen Calciums und der Menge der Gewebskoaguline. Es könnte daher vorläufig die Annahme gemacht werden, daß die erste Art Ca in chemische Verbindung mit dem Gewebskoagulin tritt, während die größere Menge Ca bei der Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin oder bei der Ausflockung des Fibrins beteiligt ist. Aber auch dieses letztere Ca wirkt im wesentlichen nur bei Anwesenheit von Gewebskoagulin.

5. Versuche mit dialysiertem Muskelextrakt beweisen, daß die in den früheren Mitteilungen festgestellten Unterschiede zwischen Gewebskoagulin und Thrombin, die den beim Wirbeltierblut bestehenden entsprechen, den Gewebskoagulinen und dem Thrombin selbst zukommen und nicht auf Beimengungen beruhen. Diese Versuche beweisen ferner, daß Gewebskoagulin unabhängig vom Thrombin die Gerinnung des Blutes der Wirbellosen herbeiführt. Das Gewebskoagulin hat nicht die Bedeutung einer Kinase.

XVI.

Zur Kenntnis der Plasteïne.

Von J. Lukomnik.

Erste Mitteilung.

1.

Trotzdem in den letzten zehn Jahren die Plasteïne ziemlich oft untersucht worden sind, kann die Frage nach dem Wesen der Plasteïnbildung nicht als entschieden angesehen werden. Ebensowenig ist festgestellt, welcher Platz in der Reihe der Eiweißkörper den Plasteïnen zuzuweisen ist.

Okuneff[1]) hält den Prozeß der Plasteïnbildung für eine Regeneration des „Peptons“ zu Eiweiß und spricht die Vermutung aus[2]), daß dieses Eiweiß sich beim Auflösen in Alkalien oder Säuren in Albuminat umwandelt. Sawjaloff[3]) und seine Anhänger fassen ebenfalls die Plasteïnbildung als einen regenerativen Prozeß auf. Maria Lawroff und S. Salaskin[4]) betrachten die Plasteïne als kondensierte Albumosen, d. h. Albumosen, die sich auf synthetischem Wege aus den Albumosen der „Peptonlösung“ gebildet haben. Sacharoff[5]) hält die den Plasteïnen verwandten Niederschläge, die bei der Einwirkung von Papayotin auf Peptonlösungen entstehen (D. Kurajeffs „Koagulosen“), für Anhydride des Antipeptons oder eines dem Antipepton nahestehenden Körpers. Bayer[6]) findet, daß das von Beimengungen gereinigte Plasteïn

---

[1]) Okuneff, Über die Rolle des Labfermentes bei den Assimilationsprozessen des Organismus. Inaug.-Dissertation. St. Petersburg 1895. S. 100 (russisch).

[2]) l. c., S. 75.

[3]) Sawjaloff, Zur Theorie der Eiweißverdauung. Inaug.-Dissertation. Jurjew 1899 (russisch). Siehe auch Centralbl. f. Physiologie 13 (16) 122.

[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 36, 277.

[5]) „Russkij Wratsch“ 1902, Nr. 49 (russisch).

[6]) Diese Beiträge 4, 554.

keine Eiweißreaktionen mehr gibt und vermutet, daß es aus einem Peptoid entstehe. Cohnheim[1]) ist der Meinung, daß das Plasteïn entweder Heteroalbumose sei, oder ein zu der Antigruppe gehörender Anteil des Acidalbumins, der sich nachher in Heteroalbumose umwandle.

Keine von diesen Theorien vermag alle bisher beobachteten Tatsachen einheitlich zu erklären. Ich habe deshalb versucht, diese Widersprüche auf experimentellem Wege zu beseitigen und so zur Aufklärung des Prozesses der Plasteïnbildung und der chemischen Natur der Plasteïne beizutragen.

2.

Zuerst habe ich versucht, die nächsten Bedingungen der Ausfällung des Plasteïnniederschlages bei der Wirkung des Labs auf „Peptonlösungen“ festzustellen.

Die Plasteïne sind bekanntlich in schwachen Säuren, selbst bei relativ großer Verdünnung derselben, ziemlich leicht löslich. Die Darstellung der Plasteïne wird aber gewöhnlich in einer Lösung, die mit Salzsäure zu 0,3 bis 0,5 Proz. angesäuert ist, ausgeführt. Man könnte also vermuten, daß die Plasteïne erst ausfallen, wenn die saure Reaktionsflüssigkeit mit ihnen völlig gesättigt ist. Wenn dann die Fermentwirkung weiter geht, so können sich die entstehenden Plasteïne nicht mehr lösen und müssen sich als Niederschlag ausscheiden. Wenn dem so wäre, müßte es möglich sein, nach dem Abfiltrieren des entstandenen Niederschlages die in der Flüssigkeit gelösten Plasteïne durch Neutralisation zu fällen. Wie jedoch bereits Sawjaloff[2]) nachgewiesen hat, gibt die vom Plasteïnniederschlag abfiltrierte Flüssigkeit gewöhnlich kein Neutralisationspräzipitat mehr. Wenn man das Filtrat im Thermostaten stehen läßt, so entsteht zwar in der Flüssigkeit nach einiger Zeit wieder ein Niederschlag, der aber als das Resultat der weiter fortschreitenden Fermentwirkung zu betrachten ist. Die Plasteïne scheiden sich somit trotz ihrer Löslichkeit in verdünnten Säuren bei ihrer Entstehung vollkommen aus.

Hingegen spricht vieles dafür, daß diese Ausfällung der Plasteïne auf deren Aussalzung durch in der Flüssigkeit vorhandene Salze, insbesondere Kalksalze, zurückzuführen ist. Schon Sawjaloff[3]) hat die äußerst leichte Aussalzbarkeit der Plasteïne fest-

[1]) Cohnheim, Chemie der Eiweißkörper, S. 95, 138. Braunschweig 1904.
[2]) l. c., S. 117.
[3]) l. c., S. 152.

gestellt. Er fand, daß selbst Nitrate und Carbonate der Alkalien Plasteïne auszusalzen vermögen, und daß schon die geringste Menge von Salzen der alkalischen Erden in ihren Lösungen gallertige Niederschläge hervorruft.

Der experimentelle Beweis dieser Vermutung ist jedoch dadurch sehr erschwert, daß wir kein Verfahren kennen, um das „Pepton“ vollständig von Salzen zu befreien, ohne damit seine Zusammensetzung sowohl qualitativ als auch quantitativ tiefgreifend zu verändern. So hat z. B. Okuneff[1]) nachgewiesen, daß eine möglichst vollständige Befreiung des „Peptons“ von Salzen mittels Dialyse seine Fähigkeit, durch Lab gefällt zu werden, stark herabsetzt[2]). Man kann aber schon a priori behaupten, daß bei der Dialyse die Zusammensetzung des „Peptons“ sich überhaupt ändert, da in das Diffusat nicht bloß Salze, sondern auch Albumosen, Peptone und Peptoide übergehen können. Und da die Diffusionsgeschwindigkeit dieser Körper nicht gleich ist, so müssen nach ziemlich lang fortgesetzter Dialyse die leichter diffundierenden Substanzen, z. B. die Peptoide, deren Rolle nicht als unbedeutend anzusehen ist[3]), aus dem Dialysierrückstand fast ganz verschwinden.

Meine Versuche haben diese Vermutung bestätigt.

Eine 5 proz. filtrierte Wittepeptonlösung wurde in einen Dialysator gebracht, mit einigen Tropfen Chloroform versetzt und gegen destilliertes Wasser, dem etwas Thymol hinzugesetzt war, dialysiert. Anfangs wurde das thymolisierte Wasser im äußeren Gefäß ein- bis zweimal täglich gewechselt, später alle zwei Tage.

Nach 18 Stunden trübte sich die Flüssigkeit im Dialysator, es bildete sich ein Niederschlag, der sich absetzte, und nach einigen Tagen war die Flüssigkeit fast ganz durchsichtig. Die Diffusate gaben während der ganzen Zeit des Dialysierens eine deutliche Biuretreaktion, während die Chlorreaktion mit Silbernitrat, die anfangs stark war, schließlich nur als schwache Opaleszenz auftrat.

Nach 12 Tagen wurde die Dialyse unterbrochen, der im Dialysator entstandene geringe bräunliche Niederschlag wurde gesammelt und in Wasser aufgeschwemmt. Auf Zusatz einer geringen Menge Chlornatrium ging er zum Teil in Lösung. Die abfiltrierte Lösung[4]), mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, gab starke Trübung. Es handelte

---

[1]) l. c., S. 74.

[2]) Dasselbe hat auch D. Kurajeff (diese Beiträge 2, 413) für die isolierte B-Albumose (nach Pick) festgestellt.

[3]) Bayer (l. c.). Vgl. auch Fischer und Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. 39, 81; Abderhalden, das. 44, 17.

[4]) Die Menge des ungelösten Teiles war zu gering, um eine nähere Untersuchung zu gestatten. Aller Wahrscheinlichkeit nach war es Dysalbumose.

sich sonach augenscheinlich um Heteroalbumose[1]). Der Rückstand der Dialyse sowie die vereinigten Diffusate wurden auf ein kleines Volumen eingedampft. Das dunkel gefärbte Diffusat gab mit einem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt reichlichen Niederschlag, die von diesem abfiltrierte Flüssigkeit bei der Sättigung mit festem Ammonsulfat noch eine Fällung. Es sind also in das Diffusat nicht bloß „sekundäre", sondern auch „primäre" Albumosen übergegangen.

Der Dialysenrückstand und das Diffusat wurden bis zu einem viertel Prozent mit Salzsäure angesäuert, mit Lablösung[2]) versetzt und in den Brutschrank gestellt. Dabei wurde der Dialysenrückstand in zwei Portionen geteilt und zu einer derselben Chlornatrium zugesetzt; abweichend von der Angabe Okuneffs[3]) hatte dieser Zusatz keine Wirkung auf den Gang der Reaktion. In dem Diffusat bildete sich schon nach einer Stunde eine starke Trübung, die allmählich zunahm und sich in kurzer Zeit in einen reichlichen Niederschlag umwandelte. Der Dialysenrückstand blieb während $2^1/_2$ Stunden vollkommen klar und trübte sich weder beim Kochen, noch bei der Neutralisation. Erst nach drei Stunden entstand darin eine schwache Trübung, die beim weiteren Stehen im Brutschrank nicht zunahm. Diese Trübung löste sich bei der Neutralisation mit Lauge auf und kehrte beim Ansäuern mit Essigsäure wieder.

Es ergibt sich also, daß das Dialysieren dem „Pepton" nicht bloß die Salze, sondern auch die zur Plasteïnbildung unentbehrlichen Stoffe entzieht.

Da es sich als unmöglich erwies, die in Rede stehende Frage auf direktem Wege zu entscheiden[4]) habe ich versucht, ein indirektes Verfahren zu verwenden und zwar die Reaktion bei Anwesenheit einer die Aussalzung hemmenden Substanz auszuführen. Als solche habe ich den Harnstoff gewählt.

Der Harnstoff hindert nach Spiro[5]) ebenso wie die Basen die Koagulation von Eiweißkörpern. Außerdem, wie Pauli und Rona[6]) nachgewiesen haben, hemmen die Nichtelektrolyte und insbesondere der Harnstoff, die Aussalzung der Kolloide durch Elektrolyte.

Meine Versuche haben gezeigt, daß feuchtes Plasteïn bei Anwesenheit von Harnstoff leicht löslich ist. Fügt man zu dem in

---

[1]) Es ist jedoch zu bemerken, daß das Dialysat nicht völlig frei von Heteroalbumose sein dürfte, da auch bei sehr lange dauernder Dialyse ein Teil derselben immer in Lösung bleibt (Pick, Zeitschr. f. physiolog. Chem. **28**, 135.

[2]) 0,2 g Labpulver Grübler wurden 24 Stunden mit 5 ccm Wasser digeriert.

[3]) l. c., S. 74.

[4]) D. h. die Peptonlösung von den vorhandenen Salzen zu befreien und dann nachzuweisen, daß bei der Einwirkung von Lab auf diese Flüssigkeit Plasteïn entsteht, das sich jedoch aus der Lösung nicht ausscheidet.

[5]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **30**, 182; s. auch diese Beiträge **4**, 300.

[6]) Diese Beiträge **2**, 38.

Wasser aufgeschwemmten Plasteïn etwas Harnstoff in Substanz hinzu, so wird nach der Lösung des letzteren die trübe, undurchsichtige Flüssigkeit völlig klar und frei von jeder Spur Opaleszenz. Beim Kochen trübt sich die Flüssigkeit allmählich[1]) und scheidet einen zarten, flockigen Niederschlag aus.

Auch auf die Aussalzung des Plasteïns wirkt der Harnstoff stark hemmend, wie es aus Tabelle I auf folgender Seite ersichtlich ist.

Andererseits hat Okuneff[2]) bemerkt, daß der Harnstoff auf den Prozeß der Plasteïnbildung hemmend wirkt. Da aber Okuneff die Reaktion der Plasteïnbildung nur auf Grund der Entstehung eines Niederschlages beurteilt, so kann das Klarbleiben der Fermentflüssigkeit in Okuneffs Versuchen auch dadurch bedingt gewesen sein, daß der Harnstoff die Aussalzung der Plasteïne verhinderte.

Für meine Versuche habe ich 10- bis 25proz. Wittepeptonlösungen verwendet, die von dem Neutralisations- und Koagulationspräzipitat befreit waren. Als Ferment benutzte ich Labpulver von Grübler, welches 24 Stunden lang mit destilliertem Wasser digeriert wurde.

Eine 10proz. neutralisierte, aufgekochte und filtrierte Wittepeptonlösung wurde mit Salzsäure ($^1/_4$ Proz.) angesäuert und mit einer 2,5proz. Lablösung versetzt (auf je 10 ccm Peptonlösung 2 ccm Lablösung). Das Gemisch wurde in zwei Portionen geteilt, zu der einen 5 Proz. Harnstoff zugesetzt, die andere diente als Kontrollprobe. Beide Proben wurden in den Brutschrank gestellt. Die Kontrollprobe trübte sich schon nach einer Stunde, während die Probe, welcher Harnstoff zugesetzt worden war, noch nach vier Stunden klar blieb. Die klare Flüssigkeit wurde neutralisiert, mit Essigsäure angesäuert und aufgekocht, wobei eine Trübung entstand. Die Flüssigkeit wurde wieder neutralisiert: beim Stehen bildete sich ein Niederschlag, der sich in Alkali löste und beim Neutralisieren wieder zurückkehrte.

Ein ganz analog ausgeführter Versuch mit 20proz. Wittepeptonlösung gab ein entsprechendes Resultat. Nach 24 Stunden hatte sich in der Kontrollprobe ein Niederschlag gebildet, während die harnstoffhaltige Probe noch ganz klar war. Aber schon drei Stunden nach Beginn des Versuches gab die harnstoffhaltige Probe bei der Neutralisation, sowie beim Aufkochen der nichtneutralisierten Flüssigkeit, eine Trübung, die sich beim Stehen in einen flockigen, gallertigen Niederschlag umwandelte.

Diese Versuche beweisen, daß auch bei Anwesenheit von Harnstoff eine Plasteïnbildung stattfindet, was an der Koagulation

---

[1]) Ich mache auf dieses allmähliche Auftreten besonders aufmerksam, da es für die Ausfällung des Plasteïns beim Kochen sehr charakteristisch ist. Es kommt öfters vor, daß eine plasteïnhaltige Flüssigkeit beim ersten Aufkochen ganz klar bleibt und erst beim fortdauernden Kochen sich zu trüben beginnt.

[2]) l. c., S. 70.

Tabelle I.

Lösung von Plasteïn aus Wittepepton in verd. HCl ccm	Harnstoff Proz.	Zur Entstehung einer Opaleszenz benötigte gesättigte Ammonsulfatlösung	Zur Entstehung einer Trübung benötigte gesättigte Ammonsulfatlösung	Bemerkungen
2	0	1 Tropfen	2 Tropfen	—
2	5	3 „	5 „	Die Trübung schwächer als in der vorigen Probe
2	10	5 „	7 „	Die Trübung noch schwächer
2	15	10 „	14 „	Ebenso

Tabelle II.

Peptonlösung ccm	5 proz. Lablösung ccm	Harnstoff Proz.	Verhalten der Flüssigkeit nach 1 Stunde	nach 2 Stunden	nach 24 Stunden
10	1	0	Klar, beim Aufkochen starke Trübung	Klar, beim Aufkochen Fällung	Gallertiger Niederschlag
10	1	5	Dasselbe	Dasselbe	Sehr zarte durchsichtige Flocken; beim Aufkochen gallertiger Niederschlag
10	1	10	Klar, beim Aufkochen Trübung	Klar, beim Aufkochen Trübung	Dasselbe, aber schwächer
10	1	15	Dasselbe	Dasselbe	Klar, beim Aufkochen geringer gallert. Niederschlag

der Flüssigkeit beim Kochen und besonders an der Ausfällung bei Neutralisation zu erkennen ist. Die Flüssigkeit bleibt jedoch völlig klar, was wohl nur durch die aussalzungshemmende Wirkung des Harnstoffs zu erklären ist.

Um die Wirkung des Prozentgehaltes an Harnstoff auf den Verlauf der Reaktion zu untersuchen, wurde der folgende Versuch angestellt.

Es wurde eine 30proz. neutralisierte, aufgekochte, filtrierte und mit Salzsäure bis zu schwach saurer Reaktion versetzte Wittepeptonlösung verwendet. Die Ergebnisse sind in nebenstehender Tabelle II zusammengestellt.

Dieser Versuch beweist, daß bei Steigerung des Harnstoffgehaltes die Menge des beim Kochen entstehenden Niederschlages abnimmt. Das wäre entweder dadurch zu erklären, daß der Harnstoff bei höherer Konzentration auch auf die Plasteïnbildung selbst hemmend wirkt, oder daß eine größere Menge von Harnstoff die Ausfällung des Niederschlages beim Kochen verhindert. Um dies zu entscheiden, wurde folgender Versuch mit Plasteïn aus Wittepepton angestellt.

Lösung von Plasteïn in verdünnter HCl ccm	Harnstoff Proz.	Gesättigte Ammonsulfatlösung	Verhalten der Flüssigkeit beim Kochen	Bemerkungen
2	0	2 Tropfen	Flockiger Niederschlag	Vor dem Aufkochen war die Flüssigkeit etwas trübe
2	5	2 „	Dasselbe	Vor dem Aufkochen klar
2	10	2 „	Dass., aber geringer	Dasselbe
2	15	2 „	Dasselbe	Dasselbe

Dieser Versuch beweist, daß bei Steigerung des Harnstoffgehaltes in einer Plasteïnlösung sich die Menge des beim Kochen entstehenden Niederschlages vermindert, obwohl die Quantität des in der Lösung vorhandenen Plasteïns dieselbe ist. Es liegt daher die Vermutung nahe, daß der Harnstoff in der von mir verwendeten Menge keine bedeutende Wirkung auf den Verlauf der Plasteïnbildung selbst ausübt, sondern nur die Aussalzung der bereits entstandenen Plasteïne durch die in der Flüssigkeit vorhandenen Salze verhindert. Damit ist selbstverständlich nicht ausgeschlossen, daß bei einem noch größeren Prozentgehalt von Harnstoff auch die Fermentwirkung selbst gehemmt werden könnte.

3.

Da es sich als unmöglich erwiesen hatte, das „Pepton“ völlig von Salzen zu befreien, ohne seine Eigenschaften zu verändern, habe ich näher untersucht, wie die Befreiung des „Peptons“ von Kalksalzen, die, wie oben erwähnt, schon in geringer Menge das Plasteïn leicht ausfällen, den Verlauf der Plasteïnbildung beeinflußt.

Okuneff[1]) hat gezeigt, daß die Befreiung des „Peptons“ von Kalk- und Magnesiumsalzen durch Fällung mit Alkohol (?) oder Ammoniumoxalat auf die Plasteïnbildung stark hemmend wirkt. Was das erste Verfahren betrifft, so kam es für unsere Zwecke nicht in Betracht, da bei der Fällung mit Alkohol das „Pepton“ je nach der Konzentration des Alkohols in zwei ganz verschiedene Fraktionen geteilt wird. Das andere Verfahren ist viel geeigneter, obwohl es nur in dem Ersatz eines stärker aussalzend wirkenden Kations durch ein schwächer wirkendes besteht[2]).

Eine 10 proz. neutralisierte Wittepeptonlösung wurde genau mit Kaliumoxalatlösung ausgefällt, bis zu einem Gehalt von etwa 28 Proz. an „Pepton“ eingedampft, filtriert und mit Salzsäure angesäuert. Die erhaltene Flüssigkeit wurde mit einer 4 proz. Lablösung versetzt und in den Thermostaten gestellt. Nach drei Stunden war die Flüssigkeit noch vollständig klar, aber schon eine Stunde nach Beginn des Versuches gab sie beim Kochen einen Niederschlag, der sich in Alkalien und Säuren löste und beim Neutralisieren wieder ausfiel. Bei Neutralisation der nicht aufgekochten Flüssigkeit entstand eine schwache Trübung, die beim Stehen deutlicher wurde. Nach längerem Stehen im Brutschranke begann die Flüssigkeit sich zu trüben und nach 24 Stunden bildete sich ein ziemlich dichter Niederschlag. Die von letzterem abfiltrierte Flüssigkeit gab bei der Neutralisation eine Trübung, die sich in Säuren und Alkalien löste und bei der Neutralisation wiederkehrte.

---

[1]) l. c., S. 74, 101.

[2]) Es ist zu bemerken, daß auch Sawjaloff einige Versuche mit von Kalk befreitem „Pepton“ angestellt hat. Dabei hat er gefunden, daß die kalkfreien Proben bei der Wirkung von Lab keinen Niederschlag bilden, aber nach einiger Zeit sich beim Kochen zu trüben beginnen. Aber die Versuche von Sawjaloff sind nicht ganz überzeugend, da von seinen Versuchen zwei ohne Ansäuerung, die anderen zwei nur unter Ansäuerung mit Essigsäure statt mit Salzsäure ausgeführt worden sind. Dabei bleibt einer der Versuche, der mit einer 5 proz. Wittepeptonlösung angestellt war, ganz unverständlich. Wie bereits Sawjaloff gezeigt hatte (l. c., S. 129) und wie auch durch meine Versuche bestätigt ist, bleibt bei dieser Konzentration des „Peptons“ die Plasteïnbildung stets aus; trotzdem soll sich nach den Angaben von Sawjaloff in diesem Versuche die Kontrollprobe schon nach einer halben Stunde getrübt und soll nach sechs Stunden einen reichlichen Niederschlag gegeben haben.

Eine 10proz. neutralisierte Wittepeptonlösung wurde genau mit Kaliumoxalatlösung beim Kochen gefällt, auf ein Drittel Volumen eingedampft, filtriert, mit Salzsäure angesäuert und mit einer 5proz. durch Kaliumoxalat gefällten und filtrierten Lablösung versetzt (auf je 10 ccm Peptonlösung 1 ccm Lablösung). Nach 24stündigem Verweilen im Brutschranke bildete sich eine starke Trübung; nach 48 Stunden verwandelte sich die Flüssigkeit in eine zarte, bewegliche Gallerte[1]).

Diese Versuche zeigen, daß auch bei Abwesenheit von Kalksalzen die Plasteïnbildung stattfindet und in gewöhnlicher Weise vor sich geht (worauf die Fällung beim Kochen und besonders bei der Neutralisation hinweist). Aber ein Niederschlag bildet sich in der Fermentflüssigkeit viel später als unter normalen Verhältnissen, d. h. erst dann, wenn die Konzentration der Plasteïnlösung infolge der fortdauernden Fermentwirkung zunimmt. Diese Tatsache ist anscheinend dadurch zu erklären, daß die viel stärker aussalzend wirkenden Kalksalze durch die schwächer wirkenden Kaliumsalze ersetzt waren. Dadurch wurde auch die vorhandene Salzmenge zu gering, um völlige Aussalzung des Plasteïns zu bewirken; während normalerweise die Plasteïne sich aus der Flüssigkeit völlig auszuscheiden pflegen[2]), verblieb in der kalkfreien Probe ein Teil des Plasteïns in Lösung, wie die bei der Neutralisation des Filtrates entstandene Trübung beweist.

Auf Grund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, daß die nähere Ursache der Ausfällung der Plasteïne während der Fermentwirkung durch Aussalzung zu erklären ist, da jene Faktoren, die auf die Aussalzung hemmend wirken, die Ausfällung der Plasteïne hemmen, ohne jedoch ihre Entstehung zu verhindern.

Diese Ergebnisse sind für die Verfolgung der Plasteïnreaktion nicht ohne Wichtigkeit. Die Plasteïnbildung darf danach nicht bloß auf Grund der Entstehung eines Niederschlages beurteilt werden, da, wie man sieht, Fälle vorkommen können, wo auch in der noch völlig klaren Flüssigkeit gelöste Plasteïne enthalten sind, deren Aussalzung nur durch irgend welche Ursache gehemmt ist. Zum Beispiel haben M. Lawroff und Salaskin[3]) bei der Wirkung von Pankreassaft auf „Pepton" keinen Niederschlag bekommen, während Herzog[4]) eine Vergrößerung der Viskosität

---

[1]) Also konnte ich Sawjaloffs Angaben nicht bestätigen, daß sich im kalkfrei gemachten „Pepton" bei der Wirkung von Lab keine Niederschläge bilden.

[2]) Sawjaloff, l. c., S. 117.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 36, 282.

[4]) l. c. 39, 308.

der Peptonlösung bei der Wirkung von Trypsin[1]) konstatiert hat. Es liegt die Vermutung nahe, daß auch bei der Wirkung von Trypsin Plasteïne entstehen, die aber infolge der alkalischen Reaktion[2]) der Flüssigkeit (es ist möglich, daß hier auch andere Ursachen wirksam sind) nicht ausgesalzen werden[3]). Ich beabsichtige später auf diese Frage näher einzugehen.

Zum Schluß ist zu bemerken, daß nach meinen Beobachtungen das gebräuchliche Verfahren der Reinigung der Plasteïne nicht völlig vor Beimengungen schützt. Meine Vorversuche haben ergeben, daß das auf gewöhnliche Weise (mittels mehrmaliger Umfällung durch Neutralisation) gereinigte Plasteïn noch eine durch Ammonsulfat schwer aussalzbare Beimengung enthält. Viel geeigneter ist folgendes Verfahren, welches auch mit geringerem Substanzverlust verbunden ist. Das ausgeschiedene Plasteïn wird sorgfältig ausgewaschen, in Alkali gelöst, vorsichtig durch Säure gefällt, der Niederschlag gut ausgewaschen, in Wasser durch Zusatz von etwas Säure gelöst und mit einer sehr geringen Menge gesättigter Ammonsulfatlösung[4]) wieder gefällt, durch wiederholtes Lösen in angesäuertem Wasser, Fällen mit Ammonsulfat und Auswaschen wieder weiter gereinigt, bis das Filtrat von dem durch Ammonsulfat erzeugten Niederschlag bei Sättigung mit Ammonsulfat in Substanz völlig klar bleibt, also keine albumosenartigen Beimengungen mehr enthält.

---

[1]) Vgl. Okuneff, Beiträge zur Biologie des Labferments (Separ.-Abdr. aus „Botkins Krankenhauszeitung" 1901; russisch), S. 10.

[2]) Cohnheim, l. c., S. 148. Siehe auch Okuneff (Dissert.), S. 69.

[3]) Meine Vorversuche haben gezeigt, daß bei amphoterer Reaktion sich in Peptonlösungen Niederschläge auch bei Einwirkung von Trypsin bilden.

[4]) Die Aussalzungsgrenzen des Plasteïns (aus Wittepepton) in saurer Lösung liegen für Ammonsulfat etwa zwischen 0,06 bis 0,12.

XVII.

Über die hydrolytischen Spaltungsprodukte des Kaseoplasteïns.

Von **L. Rosenfeld.**

Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium der Universität Charkow.

Seit A. Danilewski und Okuneff[1]) mitgeteilt haben, daß das Labferment in Albumosenlösungen die später von Sawjaloff „Plasteïne" genannten Niederschläge erzeugt, wurden diese vielfach studiert. Ihre Spaltungsprodukte sind aber bis jetzt nicht untersucht. Deshalb unternahm ich auf Veranlassung des Herrn Prof. D. Kurajeff eine qualitative und quantitative Bestimmung derselben.

Als Ausgangsmaterial benutzte ich Kaseoplasteïn, das sich wegen seiner relativ bequemen Darstellungsweise als sehr geeignet erwies.

1. Darstellung und Zusammensetzung des Kaseoplasteïns.

Das Kaseïn wurde nach Hammarsten dargestellt, einmal umgefällt und sorgfältig nachgewaschen. Zu dem feuchten Kaseïn wurde halbprozentige Salzsäure und Pepsin zugesetzt (auf je 1200 g Kaseïn 10 bis 11 Liter halbprozentiger Salzsäure und 3 g Pepsinum purissimum Grübler) und das Gemisch in den Brutschrank gestellt. Nach 4 Tagen wurde die Verdauungsflüssigkeit mit schwacher Natronlauge neutralisiert, wobei sich kein Niederschlag bildete, die neutralisierte Flüssigkeit bis zu einem etwa 30 proz. Trockensubstanzgehalt eingedampft, mit Salzsäure[2]) ($^{1}/_{4}$ Proz.) angesäuert und mit Lablösung (auf je 1200 ccm Flüssigkeit 100 ccm Lablösung[3]) versetzt.

Schon nach einer halben Stunde entstand eine Trübung, die allmählich zunahm und nach einiger Zeit sich in eine flockige Masse verwandelte. Die Mischung wurde in den auf 40° eingestellten

---

[1]) W. Okuneff, Diss. Petersburg 1895.

[2]) Auf Zusatz von Salzsäure entsteht eine Trübung, die sich beim Umrühren wieder auflöst.

[3]) 3 g Labpulver Grübler wurden einen Tag lang im Brutschrank mit 100 ccm Wasser digeriert.

Brutschrank gestellt. Nach 2 bis 3 Tagen wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert (Plasteïn A) und das Filtrat noch 5 bis 7 Tage im Brutschrank belassen. Der in dieser Zeit entstandene pulverige Niederschlag war bedeutend geringer (Plasteïn B).

Die Niederschläge wurden abfiltriert, mit kaltem und heißem Wasser gewaschen, dann durch dreimaliges Umfällen aus verdünnter Natronlauge mit Salzsäure und nachfolgendes Auswaschen mit kaltem und heißem Wasser gereinigt. Die bei der dritten Neutralisation erhaltenen Niederschläge wurden bei 80° C koaguliert, mit heißem Wasser, Alkohol und Äther nachgewaschen und getrocknet.

Um die Plasteïne völlig zu entfetten, wurden sie fein gepulvert und im Soxhletschen Extraktionsapparat mit Äther erschöpft.

Außer den oben erwähnten Fraktionen wurde ein Plasteïn auch aus den Verdauungsprodukten des Plasteïns selbst (den Plasteïnalbumosen) dargestellt. Zu 25 g Plasteïn A wurden 1 Liter halbprozentiger Salzsäure und 0,5 g Pepsinum Grübler zugesetzt und das Gemisch einer dreitägigen Verdauung unterworfen[1]). Nach dieser Zeit gab die filtrierte Flüssigkeit kein Neutralisationspräzipitat, enthielt also kein unverändertes Plasteïn. Die Verdauungsflüssigkeit wurde filtriert, neutralisiert, bis auf einen halben Liter eingedampft, mit Salzsäure angesäuert und nach Zusatz von Lablösung in den Brutschrank gebracht. Schon nach 10 bis 15 Min. entstand eine Fällung. Nach 2 Tagen wurde der gebildete, ziemlich reichliche Niederschlag abfiltriert und nach dem oben erwähnten Verfahren gereinigt (Plasteïn C).

Bei Vorversuchen über das Verhalten des Plasteïns gegen heißen Alkohol wurde das Plasteïn im Heißwassertrichter mit siedendem Alkohol behandelt. Dabei ergab sich, daß sich aus dem heißen alkoholischen Extrakt beim Erkalten ein reichlicher flockiger Niederschlag ausscheidet. Trotz mehrmals wiederholter Extraktion war eine Verminderung des beim Erkalten sich ausscheidenden Niederschlages nicht zu konstatieren. Es liegt daher die Vermutung nahe, daß das Plasteïn in heißem Alkohol völlig löslich, und daß der beim Erkalten ausgeschiedene Anteil (Plasteïn D) mit dem ungelösten Rückstand (Plasteïn E) identisch ist.

Die Ergebnisse der Elementaranalysen der sämtlichen von mir dargestellten Präparate des Kaseoplasteïns sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

---

[1]) Nach 24 Stunden bildete sich ein geringer Niederschlag, der selbst bei 20tägiger Verdauung nicht angegriffen wurde.

Plasteïn A.

	Substanzmenge	CO_2	C	H_2O	H	N	N	$BaSO_4$	S	$Mg_2P_2O_7$	P	Asche	Asche
	g	g	Proz.	g	Proz.	g	Proz.	g	Proz.	g	Proz.	g	Proz.
I . . .	0,2188	0,4724	58,88	0,1460	7,41	—	—	—	—	—	—	—	—
II . . .	0,2036	0,4366	58,48	0,1435	7,83	—	—	—	—	—	—	—	—
III . . .	0,2528	—	—	—	—	0,035 840	14,18	—	—	—	—	—	—
IV . . .	0,2108	—	—	—	—	0,029 865	14,16	—	—	—	—	—	—
V . . .	0,7280	—	—	—	—	—	—	0,0456	0,86	—	—	—	—
VI . . .	0,6785	—	—	—	—	—	—	—	—	0,0040	0,16	—	—
VII . . .	0,5214	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,0030	0,57

Plasteïn B.

	Substanzmenge	CO_2	C	H_2O	H	N	N	$BaSO_4$	S	$Mg_2P_2O_7$	P	Asche	Asche
	g	g	Proz.	g	Proz.	g	Proz.	g	Proz.	g	Proz.	g	Proz.
VIII . .	0,1986	0,4255	58,43	0,1400	7,83	—	—	—	—	—	—	—	—
IX . .	0,2001	0,4270	58,20	0,1390	7,72	—	—	—	—	—	—	—	—
X . .	0,1431	—	—	—	—	0,020 70	14,46	—	—	—	—	—	—
XI . .	0,3828	—	—	—	—	0,055 47	14,49	—	—	—	—	—	—
XII . .	0,9361	—	—	—	—	—	—	0,0498	0,73	—	—	—	—
XIII . .	0,5255	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,0035	0,67

Zusammensetzung der aschefreien Substanz von Plasteïn A.

	I	II	III	IV	V	VI	Mittelwert
C	59,20	58,83	—	—	—	—	59,01
H	7,45	7,88	—	—	—	—	7,66
N	—	—	14,26	14,25	—	—	14,25
S	—	—	—	—	0,87	—	0,87
P	—	—	—	—	—	0,16	0,16

Zur Bestimmung des Drehungsvermögens wurde eine 1,12 proz. durch Salzsäure schwach saure wässerige Lösung von Plasteïn A bereitet.

Die Bestimmung im Landoltschen Apparat gab $\alpha = -0{,}98^0$ bei 21^0 C und $l = 1$ dcm. Nach der Formel $\frac{100 \, . \, \alpha}{l \, . \, c}$ berechnet, ergibt sich

$$[\alpha]_D^{21^0} = -87{,}5^0.$$

Zusammensetzung der aschefreien Substanz von Plasteïn B.

	VIII	IX	X	XI	XII	Mittelwert
C	58,82	58,58	—	—	—	58,70
H	7,88	7,78	—	—	—	7,83
N	—	—	14,57	14,59	—	14,58
S	—	—	—	—	0,74	0,74

Plasteïn C.

	Substanzmenge g	CO_2 g	C Proz.	H_2O g	H Proz.	N g	N Proz.	Asche g	Asche Proz.	
XIV	0,2882	0,6219	58,85	0,2026	7,81	—	—	—	—	
XV	0,2192	0,4738	58,95	0,1538	7,79	—	—	—	—	
XVI	0,1982	—	—	—	—	0,02795	14,10	—	—	Kjeldahl
XVII	0,1850	—	—	—	—	0,02604	14,08	—	—	Kjeldahl
XVIII	0,2516	—	—	—	—	0,03542	14,08	—	—	Kjeldahl
XIX	0,5466	—	—	—	—	—	—	0,0022	0,40	

Zusammensetzung der aschefreien Substanz.

	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	Mittelwert
C	59,08	59,19	—	—	—	59,13
H	7,84	7,83	—	—	—	7,83
N	—	—	14,16	14,13	14,13	14,14

Plasteïn D.

	Substanzmenge g	CO_2 g	C Proz.	H_2O g	H Proz.	N g	N Proz.	Asche g	Asche Proz.	Mittelwert	
XX	0,3226	0,7021	59,35	0,2133	7,35	—	—	—	—	C	59,41
XXI	0,1958	0,4270	59,48	0,1342	7,61	—	—	—	—	H	7,48
XXII	0,1770	—	—	—	—	0,02479	14,00	—	—	N	14,03
XXIII	0,1837	—	—	—	—	0,02583	14,06	—	—	—	—
XXIV	0,4170	—	—	—	—	—	—	Spuren		—	—

Plasteïn E.

	Substanzmenge g	CO_2 g	C Proz.	H_2O g	H Proz.	N g	N Proz.	$BaSO_4$ g	S Proz.	Asche g	Asche Proz.
XXV .	0,2271	0,4830	58,60	0,1542	7,54	—	—	—	—	—	—
XXVI .	0,1958	0,4184	58,28	0,1281	7,27	—	—	—	—	—	—
XXVII .	0,1524	—	—	—	—	0,021 53	14,12	—	—	—	—
XXVIII .	0,1820	—	—	—	—	0,025 67	14,10	—	—	—	—
XXIX .	0,6500	—	—	—	—	—	—	0,0394	0,83	—	—
XXX .	0,3273	—	—	—	—	—	—	—	—	0,0020	0,61

Zusammensetzung der aschefreien Substanz.

	XXV	XXVI	XXVII	XXVIII	XXIX	Mittelwert
C	58,97	58,63	—	—	—	58,80
H	7,59	7,31	—	—	—	7,45
N	—	—	14,20	14,18	—	14,19
S	—	—	—	—	0,84	0,84

Gesamttabelle der Zusammensetzung der Kaseoplasteïne.

	A	B	C	D	E
Labwirkung	Plasteïn, welches sich während der ersten 2 bis 3 Tage der Labwirkung ausschied	Plasteïn, welches sich aus dem Filtrat vom Plasteïn A beim längeren Stehen im Brutschrank ausschied	Plasteïn aus den Verdauungsprodukten des Plasteïns A	Plasteïn, welches sich beim Erkalten des heißen Alkoholextrakts des Plasteïns A ausschied	Plasteïn, welches nach der Extraktion des Plasteïns A mit heißem Alkohol ungelöst blieb
C	59,01	58,70	59,13	59,41	58,80
H . . .	7,66	7,83	7,83	7,48	7,45
N . . .	14,25	14,58	14,14	14,03	14,19
S	0,87	0,74	—	—	0,84
P	0,16	—	—	—	—
C/N . .	4,824	4,702	4,871	4,950	4,851

2. Qualitative Untersuchung der hydrolytischen Spaltungsprodukte des Kaseoplasteïns.

A. Zersetzung des Plasteïns.

Zur Untersuchung wurden 210 g des völlig entfetteten lufttrockenen Plasteïns A verwendet. Da aber trockenes Plasteïn sich bedeutend schwerer als feuchtes löst, wurden dazu vorläufig 1060 ccm Wasser und 30 g Schwefelsäure (spez. Gewicht 1,84) hinzugesetzt und das Gemisch an einen warmen Ort gestellt. Nach 24 Stunden war das Plasteïn nur zum Teil gelöst. Zu dem Gemisch wurden noch 200 ccm Wasser und 600 g Schwefelsäure hinzugesetzt, was den von Kossel und Kutscher[1]) festgestellten Verhältnissen genau entspricht.

Das Gemisch wurde auf dem Paraffinbade 6 Stunden lang in einem Rundkolben mit Rückflußkühler gekocht. Der Kühler war mit einer mit Barytwasser gefüllten Drechselschen Waschflasche verbunden, um die Frage zu entscheiden, ob bei der Zersetzung des Plasteïns Kohlensäure entsteht. Im Beginn des Siedens wurde wiederholt ein durch Kohlensäureentwickelung hervorgerufenes Aufschäumen beobachtet, und das Barytwasser trübte sich bedeutend. Bei längerem Sieden nahm der Baryumkarbonatniederschlag nicht weiter zu.

Nach Beendigung der Zersetzung war die Flüssigkeit fast schwarz gefärbt und enthielt einen reichlichen schwarzen Niederschlag. Dieser wurde abgesaugt und sorgfältig nachgewaschen. Das Filtrat mit den Waschwässern vereinigt (Filtrat A), gab keine Biuretreaktion. Da aber der Niederschlag sehr bedeutend war und noch Eiweißreaktionen gab, war es zweifelhaft, ob die Zersetzung tatsächlich eine vollständige war. Durch eine Anzahl von Stickstoffbestimmungen wurde ermittelt, daß das gesamte verwendete Plasteïn 27,26 g, das Filtrat A 21,67 g Stickstoff, der Niederschlag also 5,59 g Stickstoff, d. h. 20,5 Proz. des Gesamtstickstoffs enthielt. Es war kaum anzunehmen, daß ein so großer Anteil des Stickstoffs den Huminsubstanzen angehöre, vielmehr lag die Vermutung nahe, daß die Zersetzung unvollkommen geblieben war.

Zwei Kontrollversuche mit kleinen Plasteïnmengen, die unter völlig gleichen Bedingungen angestellt wurden, bestätigten die Richtigkeit dieser Vermutung. Das Plasteïn wurde zunächst 5 Minuten lang mit schwefelsäurehaltigem Wasser erhitzt, wobei es sich in eine Gallerte verwandelte, die

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 165.

dann leichter durch die Schwefelsäure zersetzt wurde. Die Dauer der Zersetzung mit Schwefelsäure betrug in einem Falle 10, im zweiten 16 Stunden. Die beim Kochen gebildeten Niederschläge waren schwärzer gefärbt, gaben keine Eiweißreaktionen und enthielten: der erste (10 Stunden gekocht) 3,1 Proz. des in der zersetzten Menge des Plasteïns enthaltenen Stickstoffs, der andere (16 Stunden gekocht) 2,9 Proz. N. Diese Versuche beweisen, daß, wie es schon von anderer Seite festgestellt ist, 10 Stunden für eine völlige Spaltung genügen. Vielleicht ist die Vollständigkeit der Zersetzung von der Intensität des Siedens abhängig, da, je geringer das Volum der Flüssigkeit, um so intensiver bei gleichen Verhältnissen das Sieden ist. Auch ist möglich, daß die vollständigere Spaltung in den Kontrollversuchen dadurch bedingt war, daß das Plasteïn durch das vorläufige Aufkochen mit angesäuertem Wasser gequollen und so besser angreifbar war.

Mit Rücksicht auf das Ergebnis dieser Kontrollversuche wurde der Niederschlag des Hauptversuchs nochmals der Zersetzung durch Schwefelsäure unterworfen. Dabei verminderte er sich etwas. Das Filtrat (a) enthielt 1,344 g Stickstoff; es blieben also im Niederschlage noch immer 15,6 Proz. Stickstoff zurück. Vergleicht man dieses Resultat mit den Ergebnissen der Kontrollversuche, so ist klar, daß auch jetzt die Spaltung keine vollkommene war. Da aber dieser Umstand nur eine geringere Ausbeute an den Zersetzungsprodukten veranlassen konnte, war er für die qualitative Analyse nicht von wesentlicher Bedeutung.

B. Isolierung und Bestimmung der Basen.

Die vereinigten Filtrate A + a wurden von überschüssiger Schwefelsäure durch Calciumhydroxyd, von Ammoniak durch Kochen mit Magnesiumoxyd und von dem Rest der Schwefelsäure durch Barytwasser befreit (Filtrat B). Aus dem Filtrat B wurden Arginin und Histidin nach dem Verfahren von Kossel und Kutscher[1]) als Silberverbindungen gefällt.

Das Filtrat B wurde mit Silbersulfat gesättigt[2]) und durch Anreiben mit überschüssigem kristallinischem Baryumhydroxyd zersetzt. Der Niederschlag der basischen Silberverbindungen des Arginins und Histidins wurde abgesaugt (Filtrat C), mit Barytwasser nachgewaschen und in mit Schwefelsäure angesäuertem Wasser gelöst (Filtrat D). Da es sich jedoch ergab, daß das Filtrat C noch eine große Menge Arginin und Histidin enthielt, habe ich versucht, aus diesem das Arginin und Histidin abermals als Silberverbindungen zu entfernen. Aber auch in diesem Falle war die Fällung unvollkommen. Deshalb wurde die Flüssigkeit nach Entfernung des Silbers und Baryts mit 5 proz. Schwefelsäure versetzt und mit Phosphorwolframsäure ausgefällt, der Niederschlag abgesaugt (Filtrat E), mit Barytwasser zersetzt, aus dem durch Kohlensäure von Baryt befreiten Filtrat

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 165.
[2]) Als Indikator wurde Barytwasser benutzt (Kossel u. Kutscher, l. c.).

Arginin und Histidin als Silberverbindung durch Barytwasser gefällt. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt (Filtrat F), in mit Schwefelsäure angesäuertem Wasser gelöst und die Lösung mit dem Filtrat D vereinigt.

Das Arginin wurde vom Histidin nach dem Verfahren von Kossel und Kutscher[1]) getrennt.

Das Filtrat D wurde durch Schwefelwasserstoff von Silber und durch Baryt von Schwefelsäure befreit, das Filtrat eingedampft, mit Salpetersäure angesäuert und mit Silbernitrat (bis zum Eintreten der Endreaktion mit Barytwasser) gesättigt. Zu dieser Flüssigkeit wurde vorsichtig verdünntes Barytwasser hinzugesetzt, wobei ein flockiger Niederschlag entstand. Die Fällung wurde beendigt, als bei weiterem Zusatz von Barytwasser sich kein Niederschlag mehr bildete, und auch ammoniakalische Silberlösung keine Trübung hervorrief. Der entstandene Histidinniederschlag wurde abgesaugt, ausgewaschen und in mit Schwefelsäure angesäuertem Wasser aufgelöst (Filtrat G). Das Filtrat vom Histidinniederschlag gab nach Zusatz von überschüssigem Baryumhydroxyd einen reichlichen Niederschlag, der abgesaugt, nachgewaschen und in verdünnter Schwefelsäure gelöst wurde (Filtrat H).

Arginin. Das Filtrat H wurde von Silber durch Schwefelwasserstoff und von Schwefelsäure durch Baryt befreit, eingedampft und zur Darstellung des sauren Argininsilbernitrats benutzt, das nach Gulewitsch[2]) zur Bestimmung des Arginins am besten geeignet ist. Die erhaltenen charakteristischen Kristalle des sauren Argininsilbernitrats wurden zweimal umkristallisiert. Das über Schwefelsäure getrocknete Präparat hatte den Schmelzpunkt 180 bis 182° C, während das von Gulewitsch erhaltene bei 176 bis 183° C schmolz[3]).

1. 0,2133 g der trockenen Substanz gaben beim Glühen 0,0569 g Ag
2. 0,1427 g " " " " " " 0,0380 g "

Gefunden:	Berechnet
1. 26,68 Proz. Ag	für $C_6H_{14}N_4O_2 . HNO_3 + AgNO_3$:
2. 26,63 " "	26,50 Proz. Ag

Histidin. Das Filtrat G wurde von Silber durch Schwefelwasserstoff und von Schwefelsäure durch Baryt befreit und daraus das Histidin nach dem Verfahren von A. Kossel und A. Patten[4]) dargestellt. Die vom Schwefelsilber und Baryumsulfat abfiltrierte Flüssigkeit wurde eingedampft, mit Schwefelsäure zu einem Gehalt von 2,5 Proz. angesäuert und mit einer frisch bereiteten Lösung von Quecksilbersulfat in 15 proz. Schwefelsäure versetzt, solange diese noch eine Fällung hervorrief. Nach 24 Stunden wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert, ausgewaschen, in angesäuertem Wasser aufgeschwemmt, von Quecksilber mit Schwefelwasserstoff, von Schwefelsäure mit Baryt und von Baryt mit Kohlensäure befreit. Das erhaltene Filtrat wurde dreimal mit konzentrierter Salzsäure (spez. Gew. 1,19) eingedampft. Der Rückstand gab nach 18 Stunden eine geringe Menge Kristalle vom Habitus des Histidindichlorids, die aber noch unrein waren. Außerdem

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**, 173—175.
[2]) l. c., S. 181 u. 190.
[3]) l. c., S. 200.
[4]) l. c. **38**, 39.

ergab sich, daß das Filtrat vom Histidinquecksilber noch mit Diazobenzolsulfonsäure die für das Histidin charakteristische Reaktion[1]) zeigte. Es wurde daher sowohl die Hauptmasse als das Filtrat mit Phosphorwolframsäure gefällt, der Niederschlag wieder mit Baryt zerlegt, das Histidin neuerlich mit 5proz. Quecksilbersulfatlösung gefällt[2]) und die Niederschläge wie oben weiter behandelt. Die beim Stehen im Exsikkator erhaltenen Kristalle, die auf einem glatten Filter abgesaugt, mit Salzsäure und danach mit einem Gemisch von Alkohol und Äther gewaschen, und bei 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wurden, waren Histidindichlorid. Das erhaltene Präparat schmolz bei 224 bis 225° C[3]) und gab intensive Reaktion mit Diazobenzolsulfosäure.

1. 0,1284 g trockener Substanz gaben 21 ccm N bei 19° und 754 mm Hg
2. 0,1383 g „ „ „ 0,1726 g AgCl.

Gefunden:	Berechnet für $C_6H_9N_3O_2 . 2\,HCl$:
1. 18,64 Proz. N	18,47 Proz. N
2. 30,86 „ Cl.	31,10 „ Cl.

Das Lysin wurde nach dem Verfahren von Kossel als Pikrat identifiziert.

Das Filtrat F, das nach der Entfernung der Silberverbindungen des Arginins und Histidins erhalten war, wurde von Silber durch Schwefelwasserstoff befreit und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Niederschlag gab nach Zerlegung mit Baryumhydroxyd und Entfernung des Baryts mit Kohlensäure eine Lösung, die in passender Konzentration vorsichtig[4]) mit gesättigter alkoholischer Pikrinsäurelösung versetzt wurde, solange Fällung entstand; der Niederschlag wurde zweimal aus heißem Wasser umkristallisiert und bei 110° C getrocknet.

1. 0,1466 g trockener Substanz gaben 23,5 ccm N bei 18,9° und 760 mm Druck
2. 0,1256 g „ „ „ 20,5 „ „ „ 20° „ 758 „ „

Gefunden:	Berechnet für $C_6H_{14}N_2O_2 . C_6H_2(NO_2)_3OH$:
1. 18,51 Proz. N	18,66 Proz. N
2. 18,62 „ „	

C. Isolierung und Bestimmung einiger Aminosäuren.

Da ich das Verfahren von E. Fischer zur Isolierung der Aminosäuren nicht benutzen konnte, war ich genötigt, die einzelnen Aminosäuren nach den Angaben verschiedener Verfasser zu isolieren. Dabei mußte man beachten (was die größte Schwierigkeit bot), daß das zur Isolierung einer Aminosäure verwendete Verfahren die Möglichkeit der Darstellung der übrigen aus dem übriggebliebenen Rest nicht ausschloß.

---

[1]) S. Pauli, Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 508.

[2]) Es ist dabei zu bemerken, daß der Niederschlag in einem Überschuß des Reagens löslich ist.

[3]) Siehe Kossel und Kutscher, Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 385.

[4]) Das Lysinpikrat ist in einem Überschuß von Pikrinsäurelösung löslich.

Das Filtrat E, das nach der Entfernung der Eiweißbasen zurückgeblieben war, wurde von Phosphorwolframsäure durch Barytwasser und von Baryt durch Schwefelsäure befreit, die erhaltene Flüssigkeit eingedampft und fraktionierter Kristallisation unterworfen. Dabei wurden acht Kristallfraktionen erhalten. Davon bestand die erste aus einer Mischung verschiedener Kristalle, die zweite und dritte aus Nadeldrusen des Tyrosins; die vierte und fünfte stellte ein Gemisch von Tyrosin und Leucin dar; die sechste und siebente bestand aus Leucin, die achte erwies sich als eine Mischung verschiedener Kristalle. Die nach dem Auskristallisieren der achten Fraktion zurückgebliebene dicke Flüssigkeit gab bei weiterem Eindampfen keine Kristallisation mehr (Filtrat H).

Tyrosin. Die zweite und dritte Fraktion der Kristalle wurde zweimal aus ammoniakalischer wässeriger Lösung umkristallisiert. Die dabei erhaltenen charakteristischen schneeweißen Kristalle schmolzen bei 295 bis 296° C.

1. 0,1488 g bei 110° getrockneter Substanz gaben 10,2 ccm N bei 20° und 754 mm Druck.
2. 0,2064 g bei 110° getrockneter Substanz gaben 14,0 ccm N bei 19,5° und 752 mm Druck.

Gefunden:	Berechnet für $C_9H_{11}NO_3$:
1. 7,78 Proz. N	7,73 Proz. N
2. 7,69 „ „	

Das Präparat gab scharfe Reaktionen von Millon und Piria.

Leucin. Die vereinigte sechste und siebente Kristallfraktion wurde zweimal aus heißem ammoniakalischen Alkohol umkristallisiert.

0,1798 g bei 110° getrockneter Substanz gaben 16,6 ccm N bei 19,5° und 756 mm Druck.

Gefunden:	Berechnet für $C_6H_{13}NO_2$:
10,53 Proz. N	10,69 Proz. N

Aus einem Teile des Präparats wurde das Kupfersalz dargestellt. Das in Form von schwer löslichen Kristallschüppchen erhaltene und bei 105° C getrocknete Präparat gab folgende Zahlen:

1. 0,1739 g Substanz gaben beim Glühen 0,0420 CuO.
2. 0,2628 g „ „ „ „ 0,0640 „

Gefunden:	Berechnet für $(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$:
1. 19,29 Proz. Cu	19,53 Proz. Cu
2. 19,46 „ „	

l-αPyrrolidinkarbonsäure [1]). Das dicksirupöse Filtrat H, das nach der Auskristallisation der achten Fraktion erhalten war,

[1]) Die Isolierung dieser Aminosäure wurde nach dem Verfahren von Kossel und Dakin (Zeitschr. f. physiol. Chem. 41, 410) ausgeführt.

wurde mit absolutem Alkohol ausgezogen, das dunkelbraune Extrakt vom nicht gelösten Anteil abfiltriert und daraus der Alkohol abdestilliert. Der Rückstand wurde wieder mit Alkohol ausgezogen, das ungelöste abfiltriert. Dieses Mal löste sich das vom Weingeist befreite Extrakt in Alkohol vollständig[1]). Aus dieser Flüssigkeit wurde die α-Pyrrolidinkarbonsäure durch eine gesättigte alkoholische Quecksilberchloridlösung gefällt. Nach 24 Stunden wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert, in Wasser aufgeschwemmt, von Quecksilber durch Schwefelwasserstoff, von Salzsäure durch Silbersulfat und von Schwefelsäure durch Barytwasser befreit. Das erhaltene Filtrat wurde mit Tierkohle aufgekocht, abfiltriert und das Filtrat zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde mit heißem Alkohol aufgenommen und die Lösung erkalten lassen. Beim Stehen kristallisierten charakteristische, abgestumpfte Nadeln aus. Die ausgeschiedenen Kristalle wurden abgesaugt und wieder in heißem Alkohol gelöst. Zu der erkalteten konzentrierten Flüssigkeit wurde vorsichtig eine geringe Menge Äther hinzugesetzt. Dabei schieden sich kleine schneeweiße Kristalle aus. Sie wurden abgesaugt, gepulvert und bei 100° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Das Präparat schmolz bei 205 bis 206° C (nach Fischer 203 bis 206° C[2]).

1. 0,1334 g trockener Substanz gaben 0,2562 g CO_2 und 0,0961 g H_2O.
2. 0,1519 g „ „ „ 16 ccm N bei 20° u. 760 mm Druck.

	Gefunden:	Berechnet für $C_5H_9NO_2$:
1.	52,38 Proz. C	52,17 Proz. C
	8,00 „ H	7,83 „ H
2.	12,06 „ N	12,17 „ N

Die Bestimmung des Drehungsvermögens im Landoltschen Apparat gab für eine 2,0808 proz. Lösung $\alpha = -1,62$ bei 21° C; $l = 1$ dcm. Die spezifische Drehung ergibt sich sonach zu: $[\alpha]_D^{21} = -77,80°$, was dem von E. Fischer gefundenen Werte ($[\alpha]_D^{20} = -77,4$) sehr nahe kommt.

Aminovaleriansäure (?). Zur Darstellung der Aminovaleriansäure benutzte ich das Verfahren von Kossel und Dakin[3]), die

[1]) Nach den Angaben von Fischer und Abderhalden kann das alkoholische Extrakt außer Pyrrolidinkarbonsäure auch Tryptophan enthalten. Das von mir erhaltene Extrakt gab jedoch keine Tryptophanreaktion.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 33, 166.

[3]) l. c. 40, 565.

diese Säure mit heißem Methylalkohol extrahiert hatten, doch gelang die Isolierung nicht in befriedigender Weise.

Alle nach der Entfernung der Pyrrolidinkarbonsäure übriggebliebenen Reste wurden 45 Minuten lang mit Methylalkohol gekocht. Nach dem Abkühlen wurde die Flüssigkeit vom ungelösten Rückstande abfiltriert und aus dem Filtrat der Methylalkohol abdestilliert. Dabei blieb eine stark saure dunkel gefärbte sirupöse Flüssigkeit zurück, die in Wasser und Alkohol leicht löslich war. Aber beim Eindampfen erhielt ich aus dieser Flüssigkeit keine Kristalle, sondern einen amorphen Niederschlag. Daher versuchte ich, das Präparat aus absolutem Alkohol umzukristallisieren. Dabei schieden sich aus der Flüssigkeit nicht die charakteristischen, kristallinischen, perlmutterglänzenden Plättchen aus. Ein Versuch, das Präparat aus 70proz. Alkohol umzukristallisieren, ergab dasselbe Resultat. Ich vereinigte die aus absolutem und 70proz. Alkohol erhaltenen Präparate und verwendete sie zu einer Stickstoffbestimmung.

1. 0,1404 g trockener Substanz gaben 13 ccm N bei 21° und 756 mm Druck.

Gefunden:	Ber. für $C_5H_{11}NO_2$:	Ber. für $C_4H_7NO_4$:	Ber. für $C_6H_{13}NO_2$:
10,48 Proz. N	11,95 Proz. N	10,53 Proz. N	10,69 Proz. N

Wie aus den Ergebnissen dieser leider einzigen Analyse hervorgeht, war das von mir erhaltene Präparat jedenfalls keine reine Aminovaleriansäure und stand, seinem Stickstoffgehalt nach, eher der Asparaginsäure oder dem Leucin nahe. Aus dem noch gebliebenen Teile des Präparats wurde das Kupfersalz durch Kochen mit frischgefälltem Kupferkarbonat dargestellt. Die erhaltenen Kristalle hatten jedoch nicht die für das aminovaleriansaure Kupfer charakteristische Form.

2. 0,0716 g trockener Substanz gaben beim Glühen 0,0178 g CuO.

Gefunden:	Berechnet für $(C_5H_{10}NO_2)_2Cu$:	Berechnet für $(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$:
19,86 Proz. Cu	21,48 Proz. Cu	19,53 Proz. Cu

Es war also auch dieses Präparat kein reines aminovaleriansaures Kupfer, sondern mehr dem Leucinkupfer ähnlich [1]). Ich habe nun auch noch aus der Mutterlauge, die nach der Ausscheidung dieses Präparats zurückgeblieben war, ein Kupfersalz dargestellt.

3. 0,0595 g trockener Substanz gaben beim Glühen 0,0142 CuO.

Das Präparat enthielt also 19,07 Proz. Kupfer. Ein Gemisch von Aminovaleriansäure und Phenylalanin würde ähnliche Zahlen verlangen.

Leider schloß die vorhandene geringe Menge des Präparats seine weitere Reinigung aus.

Phenylalanin. Zur Darstellung des Phenylalanins benutzte ich das Verfahren von Schulze und Winterstein [2]), das auf der Schwerlöslichkeit des Phosphorwolframates beruht.

---

[1]) In diesem Falle war auch schwerlich zu vermuten, daß das Präparat das von E. Fischer (Zeitschr. f. physiol. Chem. 33, 162) beobachtete Kupferdoppelsalz der Aminovaleriansäure und des Leucins sei, da diese Verbindung 20,48 Proz. Kupfer enthält.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 35, 217.

Der Rückstand, der nach dem Extrahieren der Aminovaleriansäure durch Methylalkohol geblieben war, wurde in ammoniakhaltigem, siedendem Wasser aufgelöst, die Lösung abfiltriert und bis zum Erscheinen einer Kristallhaut eingedampft. Beim Erkalten schied sich eine ziemlich reichliche Menge von Kristallen aus, die die für Tyrosin charakteristische Form hatten und starke Millonsche Reaktion gaben. Die davon abfiltrierte Mutterlauge gab bei weiterem Eindampfen noch zwei Kristallfraktionen, von welchen die erste als ein Gemisch von Tyrosin und Leucin, die andere als reines Leucin erkannt wurde. Die Kristalle wurden abgesaugt, die Mutterlauge mit Wasser verdünnt, heiß mit einem Überschuß von Baryumkarbonat behandelt, abfiltriert, bis auf ein kleines Volum eingedampft und mit Alkohol gefällt. Nach 24 Stunden wurde der Niederschlag (A_1) abgesaugt und das Filtrat bis zum Erscheinen einer Kristallhaut eingedampft. Nach 24 Stunden wurden die ausgeschiedenen Kristalle abgesaugt (B_1), die Mutterlauge wieder mit Alkohol gefällt, der Niederschlag (A_2) abfiltriert, das Filtrat wieder bis zur beginnenden Kristallisation eingedampft, die ausgeschiedenen Kristalle (B_2) abgesaugt und so noch ein drittesmal verfahren (A_1 und B_3). Alle drei Kristallfraktionen $B_1 + B_2 + B_3$ wurden vereinigt und aus wenig Wasser umkristallisiert. Die erhaltenen Kristalle in 5proz. Schwefelsäure gelöst und nach Entfernung des Baryumsulfats mit 10proz. Phosphorwolframsäurelösung gefällt, gaben einen äußerst geringen Niederschlag, der sich nach 24 Stunden in charakteristische, weiße tafelartige Kristalle umwandelte, die in heißem Wasser gelöst wurden. Die Zerlegung des Phosphorwolframats mit Barytwasser ergab eine geringe Menge einer Substanz, die keine bestimmte kristallinische Form hatte. Da weitere Reinigung durch Umkristallisation wegen der äußerst geringen Menge des Präparats unmöglich war, habe ich daraus durch Lösen in Wasser, vorsichtigen Zusatz von Kupferacetat und Eindampfen auf ein geringes Volum das Kupfersalz dargestellt, das sich in kleinen schuppenartigen Kristallen ausschied. Leider reichte die erhaltene Menge des Präparats nach dem Umkristallisieren kaum zu zwei Kupferbestimmungen.

1. 0,0194 g Substanz gaben beim Glühen 0,0038 g CuO
2. 0,1332 g „ „ „ „ 0,0264 g CuO

Gefunden:	Berechnet für $(C_9H_{10}NO_2)_2Cu$:
1. 15,65 Proz. Cu	16,21 Proz. Cu
2. 15,83 „ „	

Es war also das Präparat, wie es auch seine kristallinische Form bewies, aller Wahrscheinlichkeit nach nicht ganz reines Phenylalaninkupfer.

Glutaminsäure. Zur Darstellung der Glutaminsäure habe ich das Verfahren von Kutscher[1]) benutzt, das auf der schweren Löslichkeit des glutaminsauren Zinks in Wasser beruht. Die Niederschläge $A_1 + A_2 + A_3$, die bei der Trennung des Phenylalanins

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 38, 111.

erhalten waren, sowie das Filtrat, das nach der Ausscheidung der Kristallfraktion B_3 geblieben war, wurden mit Wasser verdünnt und von Baryt durch Schwefelsäure befreit. Das erhaltene Filtrat wurde mit Zinkkarbonat bis zum Aufhören der Kohlensäureentwickelung gekocht. Nach 24 Stunden wurde der entstandene Niederschlag nebst dem überschüssigem Zinkkarbonat abfiltriert. Das Filtrat sollte zur Darstellung der Asparaginsäure dienen. Der Niederschlag wurde in siedender Essigsäure aufgelöst, die heiße Lösung durch Schwefelwasserstoff von Zink befreit und das erhaltene Filtrat zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde gelöst, die Lösung filtriert, nochmals zur Trockne eingedampft und diese Prozedur dreimal wiederholt. Beim dritten Eindampfen schieden sich aus der Flüssigkeit beim Erkalten Kristalle aus. Zur Bestimmung wurde das Präparat in die salzsaure Verbindung überführt. Dazu wurden die erhaltenen Kristalle zweimal mit Salzsäure (spez. Gewicht 1,19) aufgekocht. Beim Stehen im Exsikkator schieden sich aus der Lösung nach einigen Stunden charakteristische, kleine, nadelförmige Kristalle aus, die auf einem glatten Filter abgesaugt, mit Äther nachgewaschen, gepulvert und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wurden. Sie schmolzen bei 193 bis 194° C. Leider genügte die erhaltene Menge nur für eine Chlorbestimmung.

0,0587 g trockener Substanz gaben 0,0450 g AgCl.

Gefunden:	Berechnet für $C_5H_9NO_4 . HCl$
18,95 Proz. Cl	19,35 Proz. Cl

Es war also das Präparat, wie seine kristallinische Form, der Schmelzpunkt und der Chlorgehalt bewiesen, ziemlich reines Glutaminsäurechlorhydrat.

Asparaginsäure. Die Asparaginsäure sollte nach dem Verfahren von Kutscher[1]), das auf der Unlöslichkeit des asparaginsauren Silbers in Wasser beruht, isoliert werden.

Das Filtrat, das nach der Entfernung des glutaminsauren (und des kohlensauren) Zinks erhalten war, wurde mit Silbernitrat gefällt. Nach 24 Stunden wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert, nachgewaschen, in Wasser aufgeschwemmt und durch Schwefelwasserstoff von Silber befreit. Aus der erhaltenen Flüssigkeit wurde das Kupfersalz durch Kochen mit frisch gefälltem Kupferkarbonat dargestellt. Die beim Erkalten ausgeschiedenen Kristalle hatten keine charakteristische Form.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 38, 111.

1. 0,2011 g trockener Substanz gaben beim Glühen 0,0461 g CuO.

Gefunden:	Berechnet für $C_4H_5NO_4Cu$
18,31 Proz. Cu	32,54 Proz. Cu

Beim Eindampfen der Mutterlauge, die nach der Ausscheidung der oben erwähnten Kristalle geblieben war, wurden noch fünf Fraktionen des Kupfersalzes erhalten. Sie wurden einzeln analysiert.

2. 0,1647 g	trockener	Substanz	gaben	0,0383 g	CuO	= 18,58	Proz. Cu
3. 0,0356 g	„	„	„	0,0096 g	„	= 21,55	„ „
4. 0,1052 g	„	„	„	0,0290 g	„	= 22,03	„ „
5. 0,1537 g	„	„	„	0,0465 g	„	= 24,17	„ „
6. 0,1138 g	„	„	„	0,0371 g	„	= 26,05	„ „

Die letzteren Fraktionen nähern sich mehr und mehr dem asparaginsauren Kupfer, was sich augenscheinlich durch die geringere Löslichkeit des Leucinkupfers erklärt, aus welchem, wie nach der Kristallform zu schließen, die ersten Fraktionen zum größten Teil bestanden. Es ist mir leider nicht gelungen, reines asparaginsaures Kupfer darzustellen, aber meiner Meinung nach weisen diese Ergebnisse doch darauf hin, daß in der Zahl der Spaltungsprodukte des Kaseoplasteïns die Asparaginsäure nicht fehlt.

3. Quantitative Untersuchung der hydrolytischen Spaltungsprodukte des Kaseoplasteïns.

Die quantitative Untersuchung der hydrolytischen Spaltungsprodukte des Kaseoplasteïns wurde genau nach den Vorschriften von Kossel und Kutscher[1]) ausgeführt. Dazu wurden 22,2682 g des trockenen völlig entfetteten Plasteïns verwendet, das 14,24 Proz. N enthielt. Bei der Spaltung wurden die oben erwähnten, auf die Vollständigkeit der Zersetzung hinzielenden Bedingungen erfüllt. Die durch vorheriges Behandeln mit angesäuertem Wasser in eine Gallerte übergeführte Substanz wurde 16 Stunden mit Schwefelsäure von bekannter Konzentration[2]) im Sieden erhalten. Die Ergebnisse sind aus nachstehender Tafel ersichtlich.

[1]) l. c. 31, 165.
[2]) Kossel und Kutscher, l. c., S. 168.

Tabelle I.

Verteilung des Stickstoffs unter den Spaltungsprodukten des Kaseoplasteïns.

	Stickstoffmenge g		Prozente des Gesamtstickstoffs	
Gesamtmenge	3,171	—	100,00	—
A. Basenstickstoff	0,736	—	23,21	—
Davon a) im Ammoniak	—	0,099	—	3,12
b) im Histidin	—	0,146	—	4,60
c) im Arginin	—	0,234	—	7,38
d) im Lysin	—	0,257	—	8,11
B. Stickstoff in unbekannter Form	2,435	—	76,79	—
Davon a) im ersten schwarzen Niederschlage	—	0,138		
b) im Baryt-Magnesia-Niederschlage	—	0,531		
c) in den Niederschlägen bei der Trennung der Arginin-Histidinfraktion	—	0,136	—	30,37 (a–e)
d) in den Niederschlägen bei der Trennung des Histidins vom Arginin	—	0,059		
e) in den Niederschlägen bei der Trennung des Lysins von der „Aminosäurenfraktion“	—	0,099		
f) im Filtrat nach der Entfernung des Lysins („Aminosäurenfraktion“)	—	1,472	—	46,42
		3,171		100,00

Tabelle II.

	g	Prozente
Zersetztes Plasteïn	62,268	100,00
Ammoniak	0,120	0,54
Histidin	0,539	2,42
Arginin	0,727	3,26
Lysin	1,340	6,01

Ergebnisse.

Auf Grund der angeführten Tatsachen kann man folgende Schlüsse ziehen:

1. Die fünf von mir auf verschiedene Weise dargestellten Präparate von Kaseoplasteïn zeigen große Ähnlichkeit in ihrer elementaren Zusammensetzung. Wie schon von anderen Autoren gefunden worden ist, besitzen auch meine Präparate von Kaseoplasteïn im Vergleich mit dem Kaseïn einen hohen Kohlenstoff- und verhältnismäßig niedrigen Stickstoffgehalt; nur sind meine Kohlenstoffzahlen noch größer als diejenigen von Sawjalow[1]) (55,74 Proz.) und Kurajeff[2]) (57,06 Proz.), was sich vielleicht durch sorgfältigere Reinigung erklären läßt.

2. Unter den hydrolytischen Spaltungsprodukten des Kaseoplasteïns konnte ich Arginin, Histidin, Lysin, Tyrosin, Leucin, α-Pyrrolidinkarbonsäure, Phenylalanin und Glutaminsäure nachweisen; die anderen Aminosäuren, die im Kaseïn gefunden worden sind, vermochte ich, vielleicht wegen meiner unvollkommenen Methode, nicht zu isolieren.

3. Der Unterschied zwischen dem Kaseoplasteïn und Kaseïn in betreff der Stickstoffverteilung ist aus der folgenden Tabelle ersichtlich.

	Kaseïn nach Hart[3])	Kaseoplasteïn
Amidstickstoff	9,48	3,12
Diaminostickstoff	20,53	20,09
Stickstoff in unbekannter Form	69,99	76,79

4. Quantitativ unterscheidet sich also das Kaseoplasteïn merklich vom Kaseïn. Ob auch in qualitativer Zusammensetzung ein wesentlicher Unterschied vorhanden ist, müssen weitere, nach der Estermethode von E. Fischer ausgeführte Untersuchungen zeigen.

[1]) Dissert. Jurieff 1899, S. 175.
[2]) Diese Beiträge 2, 420.
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 33, 347.

XVIII.

Eine Methode zur chemischen und biologischen Untersuchung überlebender Organe.

Von Dr. **Wilhelm Wiechowski,**
Privatdozenten und Assistenten am Institute.

Aus dem pharmakologischen Institute der deutschen Universität Prag.

Die Ausarbeitung der im folgenden beschriebenen Methode wurde durch die Schwierigkeiten veranlaßt, welchen das Arbeiten mit frischen tierischen Organen begegnet. 1. Ein quantitatives Arbeiten mit frischen tierischen Organen, namentlich dann, wenn ein Vergleich homologer wie heterologer Organe verschiedener Individuen gleicher oder verschiedener Art beabsichtigt wird, ist eigentlich unmöglich. Neben dem Wassergehalt hindert auch der Gehalt an lipoiden Stoffen (Fett, Lecithin usw.) und der an alkohollöslichen Extraktivstoffen einen Vergleich der frischen Organe, da der oft sehr beträchtliche Gehalt an solchen Stoffen schwankend ist. Ferner ist selbst die einfachste Fraktionierung, die Filtration von Organaufschwemmungen infolge der Anwesenheit der eben erwähnten Stoffe quantitativ nicht durchführbar, und schließlich lassen sich die zur Zertrümmerung der Zellen verwendeten Zusätze (Sand, Glaspulver, Kieselgur usw.) aus den Organemulsionen nicht mehr entfernen und verhindern dadurch die Reindarstellung bzw. Messung unlöslicher Organfraktionen. (Von der Verreibung im gefrorenen Zustande bei Gegenwart von flüssiger Luft nach Mac Fadyan [1]) ist hier abgesehen; es ist mir nicht bekannt, ob sich diese Methode auf tierische Organe anwenden läßt.) 2. Behindern die Begleitstoffe der Organproteïne auch das Studium der Organe in qualitativer Hinsicht. Sie erschweren nicht nur die Reindarstellung von wirksamen Organfraktionen und der spontanen Zersetzungsprodukte der Organproteïne, sondern

---

[1]) Chem. Zentralbl. 1903, II, 1195.

auch die Darstellung der Reaktionsprodukte von Stoffen, welche man der Einwirkung der Organe unterworfen hat. (Es ist auch nicht ausgeschlossen, daß sich die Begleitstoffe selbst an Reaktionen beteiligen, die durch Organfermente ausgelöst werden, was bei ihrer, wie mir scheint, bisher unterschätzten Masse zu Irrtümern Veranlassung geben kann.) Schließlich scheinen, wie ich beobachtet habe, jene Extraktstoffe, wenigstens für gewisse überlebende Organleistungen eine Hemmung zu sein. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß auch hier die Stoffwechselprodukte des Organlebens es sind, welche die Hemmung bedingen und daß ihre Entfernung für die überlebende Tätigkeit von gleicher Bedeutung ist wie die permanente Durchspülung des Langendorfschen Herzpräparates mit der hierdurch erreichten Entfernung von Stoffwechselprodukten für die postmortale Tätigkeit des Säugetierherzens. 3. Ist die leichte Veränderlichkeit der Organe nach dem Tode, sowohl hinsichtlich der Eiweißkörper als der Fermente, für viele Untersuchungen sehr erschwerend.

Aus diesen Überlegungen ergab sich das Problem, die Organproteïne (und Fermente) in ihrer Gesamtheit frei von allen Begleitstoffen darzustellen und zwar in einer Weise, welche den Zustand, in welchem sie sich im Augenblicke des Todes des Tieres befinden, nicht nur nicht verändert, sondern konserviert.

Die Methode, welche, wie ich glaube, diese Forderungen erfüllt, besteht im wesentlichen darin, daß die blutfrei gespülten Organe rasch getrocknet, in trockenem Zustande in einem gleich zu beschreibenden Apparate mit Toluol gemahlen und schließlich in der Kälte nacheinander mit Toluol und Aceton (oder Alkohol) extrahiert werden. Hierdurch werden die Organe als feine, wägbare Pulver erhalten, die frei von lipoiden und Extraktstoffen sind. Die Organzellen sind zertrümmert, Eiweißkörper und Fermente unverändert, löslich und haltbar. Nur die Organsalze und das Kochsalz der Spülflüssigkeit begleiten die im übrigen auch von Farbstoffen fast freien Organproteïne.

1. Das Trocknen der Organe. Die dem frisch getöteten Tiere entnommenen Organe werden möglichst rasch mit physiologischer Salzlösung blutfrei gespült und hierauf zunächst grob durch eine Fleischhackmaschine[1]), Stampfen oder Reiben zerkleinert. Um die Zellen möglichst von bindegewebigen Anteilen, Blutgefäßen, Ausführungsgängen zu sondern, namentlich aber, um eine gleich-

[1]) Diese vorbereitende Zerkleinerung könnte auch zweckmäßigerweise mit dem Kosselschen Apparat (Zeitschr. f. physiol. Chem. 33, 5) vorgenommen werden.

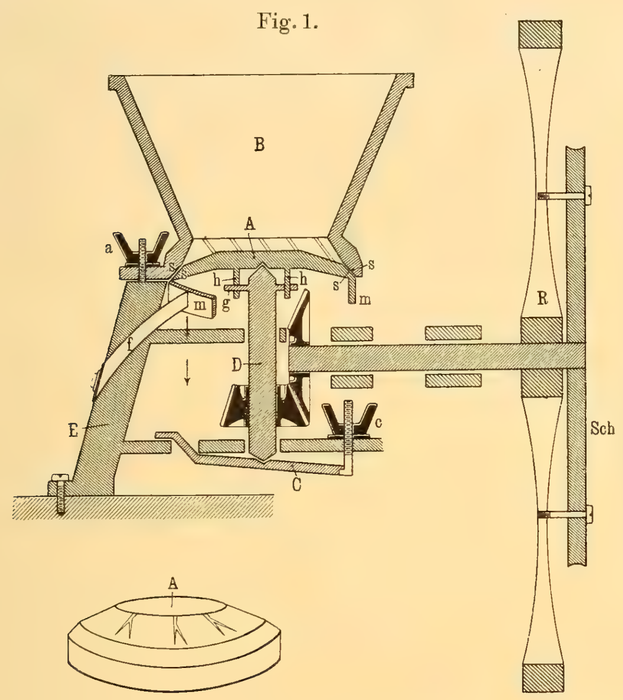
mäßige feine Verteilung zu erzielen, wird dann der grobe Organbrei durch Siebe aus Kupferdrahtnetz passiert. Bei weichen Parenchymen (z. B. Kaninchenleber) kann man sofort ein feines Sieb anwenden; bei zähen Organen (z. B. Nieren) ist es zweckmäßig, zunächst ein gröberes Sieb zu benutzen und den erzielten Brei dann erst durch ein feinmaschiges zu treiben. Auf diese Weise erhält man einen sehr feinen Zellbrei, der, mit etwas Toluol versetzt, in möglichst dünner Schicht auf Glasplatten ausgestrichen wird. Die Glasplatten werden dann in einen mäßig warmen, gut ventilierten Raum gebracht, wo der Organbrei in kurzer Zeit vollkommen trocknet. In günstigen Fällen können die Organe vier Stunden nach dem Tode des Tieres bereits völlig trocken und hierdurch konserviert sein. Das Wesentliche ist hierbei, eine möglichst feine Verteilung (engmaschiges Sieb), dünnste Schicht, gute Ventilation und möglichst geringe Verdünnung des Zellbreies durch Spülflüssigkeit. Eine sehr gleichmäßige dünne Ausbreitung des Zellbreies auf den Glasplatten erhält man dadurch, daß man denselben über die schräg gestellte Platte langsam herabfließen läßt und den Strom mit einem elastischen Malerspatel über die ganze Breite der Platte leitet. Beim Blutfreispülen werden die Organe meist sehr ödömatös; durch Drücken läßt sich ein Teil der überschüssigen Flüssigkeit entfernen.

Beim Trocknen ist das Hauptgewicht auf gute Ventilation zu legen. Die Temperatur darf natürlich nicht hoch sein, es genügt eine solche von 30 bis 37^{0} vollkommen, ja sogar Zimmertemperatur (15^{0}) reicht aus, wenn man für raschen Luftwechsel sorgt. Ich habe mich davon überzeugt, daß durch einen ausgiebigen Luftstrom das Trocknen noch in viel kürzerer Zeit bewerkstelligt werden kann und es ließe sich, wenn es nötig werden sollte, unschwer eine Anordnung treffen, die durch einen starken Strom getrockneter Luft den dünn ausgebreiteten Organbrei in kürzester Zeit noch bei viel niedrigerer Temperatur zu trocknen imstande wäre.

Das in dieser Weise vorgenommene Trocknen verändert weder die Eiweißkörper der Organe, noch schädigt es ihre Fermente. Das letztere wurde durch die Tatsache bewiesen, daß die Organe (Rinderniere, Rinderleber, Hundeleber) ihre Fähigkeiten, Harnsäure zu bilden und zu zerstören, Wasserstoffsuperoxyd zu spalten, sowie autolytisch zu zerfallen, durch das Trocknen nicht einbüßen; diese Eigenschaften werden im Gegenteil konserviert. Es ist bekannt, daß sich die Eiweißkörper des Blutserums beim Trocknen (37 bis 40^{0}) nicht verändern, für die Organeiweißkörper war ein solches Ver-

halten nicht ohne weiteres wahrscheinlich, nachdem Pohl[1]) im Organplasma einen Eiweißkörper fand, der schon bei 37° in kurzer Zeit koagulierte. Es zeigte sich aber, daß durch das rasche Trocknen selbst bei 37° dieser Eiweißkörper nicht unlöslich wird; aus den getrockneten Organen lassen sich ebenso wie aus frischen Extrakte gewinnen, welche den leicht koagulierbaren Eiweißkörper enthalten.

Fig. 1.



2. Das Zermahlen der Zellen. Zum Zermahlen der Zellen bediene ich mich einer Farbenreibmühle, wie sie zur Herstellung von Ölfarben allgemein benutzt wird.

Die Konstruktion des Apparates gleicht jener der in den Apotheken verwendeten Salbenmühlen; da sie vielleicht nicht allgemein bekannt sein dürfte, beschreibe ich sie in Kürze (siehe Fig. 1). Die abnehmbare Scheibe *A* wird durch den Hebel *C* und die Achse *D* mittels der Flügelschraube *c* nach oben gegen den gleichfalls abnehmbaren, durch drei Flügelschrauben (*a*) auf einem Gestell (*E*) fixierten Konus *B* gedrückt. Die Berührungsflächen sind etwa 2 mm breite schräge Schliffe (*ss*), gegen die sowohl am Konus als an der Scheibe kleine Rinnen führen. Die Richtungen der Zylinderrinnen und Scheibenrinnen kreuzen sich, indem die

[1]) Diese Beiträge 7, 381 (1906).

ersteren in der Drehrichtung der Scheibe schräg absteigen, während die letzteren in entgegengesetzter Richtung verlaufen. Die Scheibe (*A*) balanziert auf der durch Zahnradübertragung drehbaren Achse (*D*), welche durch den horizontalen Mitnehmer *g* und die an der unteren Fläche der Scheibe angebrachten Stifte *h* die Scheibe im Sinne des Uhrzeigers in Rotation versetzt. Die an dem aus weichem Eisenguß hergestellten recht roh gearbeiteten Fabrikate befindliche Kurbel für Handbetrieb wurde durch eine mit Schwungrad (*R*) verbundene Schnurscheibe (*Sch*) ersetzt, welche die Verwendung eines Elektromotors als treibende Kraft gestattet. Um außerdem auch in wässerigen Flüssigkeiten mahlen zu können, ohne von Rostbildung gestört zu werden, wurde Scheibe und Zylinder vernickelt. Durch die Flügelschraube des Hebels (*c*) lassen sich die schleifenden Flächen von Scheibe und Zylinder so nähern, daß an der Berührungsgrenze beider eine in den Zylinder gegossene selbst sehr leicht bewegliche Flüssigkeit (Äther, Toluol) nicht heraussickert; erst beim Drehen der Scheibe wird durch die Rotation Flüssigkeit in den kapillaren Raum, den die schleifenden Flächen bilden, gezogen und erscheint als feuchter Streifen auf dem äußeren zylindrischen Mantel der Scheibe (*m*). Von hier wird die Flüssigkeit durch eine auf dem Scheibenmantel schleifende Feder *f* aufgenommen, rinnt an dieser herunter und tropft in ein untergestelltes Gefäß.

Das Prinzip dieser Farbenmühle erscheint für das Mahlen fester Substanzen in Flüssigkeiten in hohem Grade zweckmäßig, der Apparat hat aber in seiner gegenwärtigen Form noch gewisse Fehler. Zunächst ist der Hebemechanismus durch den lockeren Hebel *C* sehr unvollkommen, da sich beim Bewegen der Flügelschraube *c* der Stützpunkt der Achse auch in horizontaler Richtung etwas verschieben und dadurch die Scheibe dezentrieren kann, was die Bewegung plötzlich unmöglich machen muß. Ferner ist es unzweckmäßig, daß die Scheibe an der Achsenspitze balanciert. Hierdurch wird das Mahlen harten Materiales von ungleichem Korne sehr erschwert oder unmöglich. Das Eindringen eines größeren harten Kornes zwischen die Zuführungsrillen drückt die balancierende Scheibe an der betreffenden Stelle herab, wogegen sie an der entgegengesetzen Stelle (wenn hier nicht ein ebenso großes Korn wie dort eingedrungen ist) hinauf gegen den Zylinder gehoben wird; dadurch wird hier der kapillare Schleifraum verengt, dort aber erweitert; die Drehung wird aufgehoben und andererseits tritt grob zerkleinertes Material an der gespreizten Stelle aus. Schließlich ist das Material von Scheibe und Zylinder unzweckmäßig, weil sich der weiche Eisenguß selbst deutlich abschleift, namentlich wenn härtere Stoffe sehr fein gerieben werden sollen. Dagegen lassen sich trotz dieser Fehler schon jetzt insbesondere durch öfteres Mahlen mit sukzessive immer enger gewähltem Schleifraum ungemein feine Suspensionen erzielen, und bei den auch im trockenen Zustande (im Gegensatze zum Serum) nicht sehr harten tierischen Organen machen sich die genannten Übelstände nicht allzusehr bemerkbar. Jedenfalls soll aber versucht werden, die genannten Konstruktionsfehler zu beseitigen und den Apparat auch höheren Anforderungen entsprechend bzw. allgemein anwendbar zu machen.

In dem beschriebenen Apparate werden die getrockneten Organe zusammen mit Toluol, eventuell einige Male hintereinander

zu einer feinen Suspension vermahlen, durch Nachspülen mit Toluol unter Zuhilfenahme eines Borstenpinsels läßt sich der Zylinderinhalt so gut wie quantitativ gewinnen. Die erhaltenen Suspensionen oder Emulsionen sind bei genauem Arbeiten so fein, daß sie selbst nach 24stündigem Stehen nur wenig Bodensatz absetzen und nur langsam unter Anwendung des Vakuums filtrieren; sie erscheinen wohl infolge des verschiedenen Lichtbrechungsvermögens des Toluols tiefdunkelbraun im Gegensatz zu Emulsionen in Alkohol, Äther oder Petroläther, welche hellgrau erscheinen. Außerdem aber scheinen die aromatischen Kohlenwasserstoffe auch anders zu wirken. Suspensionen in Toluol oder Benzol setzen sich viel langsamer ab als solche in Petroläther oder Äther, ferner geben die später zu erwähnenden Alkoholextrakte mit Toluol keine Fällung, wohl aber mit Äther. Jedenfalls hat sich das Toluol als das weitaus beste Extraktionsmittel erwiesen. Verreibt man angetrocknete Tropfen solcher Emulsionen mit Wasser auf einem Objektträger, trocknet, fixiert in der Flamme und färbt mit Methylenblau, so findet man in gelungenen Fällen überhaupt keine intakten Zellen und Zellkerne, sondern nur eine gleichmäßig gefärbte Fläche. — Bemerkenswerterweise läßt sich dieses Resultat (die Zertrümmerung der Zellkerne) nur mit getrocknetem Material erzielen (wenigstens bei der gegenwärtigen Konstruktion des Apparates); frische Zellen schlüpfen durch jene kapillaren Räume ohne zerdrückt zu werden, ebenso Blutkörperchen. Frische Hefe und Stärkekörner werden nur in geringem Maße zermahlen. Aus diesem Grunde wurde von dem Versuche abgesehen, auch Bakterien in diesem Apparate zu zerkleinern, es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß bei verbesserter Konstruktion der Apparat auch dieses zu leisten imstande sein wird.

3. Die Extraktion. Die Extraktion der so erhaltenen Suspensionen ist wegen ihrer Feinheit weder in einem automatischen Extraktionsapparate noch durch Waschen auf dem Filter gut möglich, man muß die Pumpe zu Hilfe nehmen. Die Suspensionen werden auf einer Nutsche filtriert, was zwar langsam aber mit gleichmäßiger Geschwindigkeit vonstatten geht. Die Extraktion erfolgt dann weiter durch Waschen mit Toluol auf der Nutsche bis das Toluol farblos abläuft. Zweckmäßiger ist es, den auf der Nutsche verbleibenden scharf abgesaugten Kuchen mit frischem Toluol zu zermahlen, dieses wieder abzunutschen und diese Prozedur bis zur Erschöpfung fortzusetzen, hierbei kann man das Toluol jedesmal einige Stunden bei 37 bis 40° auf das Organ-

pulver einwirken lassen. Schließlich wird der scharf abgesaugte Kuchen grob zerdrückt und das noch anhaftende Lösungsmittel bei 37⁰ verdampfen gelassen. So erhält man schließlich ein feines, hellgelbes Organpulver, welches Eiweißkörper und Fermente in unverändertem, löslichen Zustande enthält. Solche Pulver von Rindernieren, Rinderleber oder Hundeleber verhalten sich ebenso wie diese Organe im frischen bzw. getrockneten Zustande und behalten ihre spezifischen Eigenschaften noch nach monatelangem Aufbewahren in Glasbüchsen bei Zimmertemperatur. Mit Wasser angerieben, erhält man zum Unterschiede von frischen Organemulsionen gut und vollständig durch Papier filtrierbare Suspensionen, die Filterrückstände lassen sich auf dem Filter waschen oder besser durch Abnehmen, Verreiben mit Salzlösung und neuerliches Filtrieren quantitativ von allen löslichen Eiweißkörpern befreien. Diese Filtrate zeigen durchaus die Eigenschaften des Pohlschen Organplasmas; sie fallen mit sehr verdünnter Essigsäure, koagulieren schon bei 37⁰, ja trüben sich und koagulieren auch nach einer gewissen Zeit bei Zimmertemperatur, weshalb zur quantitativen Plasmagewinnung die Filtration in der Kälte vorgenommen werden muß.

Statt Toluol kann man natürlich auch Benzol oder Xylol verwenden, Petroläther oder Äther sind dagegen wegen ihrer Leichtflüchtigkeit ausgeschlossen, scheinen übrigens auch etwas anders zu wirken. Das Toluolextrakt ist meist dunkelbraun gefärbt und eigenartig riechend. Ich führe einige Zahlen an, um den absoluten und relativen Gehalt einiger Organe an Toluolextrakt zu illustrieren.

Rinderniere V. lieferte 73,06 g Pulver und 8,63 Toluolextrakt = 11,8 Proz. des trockenen Organs.

Rinderniere XI. lieferte 16,55 g Pulver und 1,5 Toluolextrakt = 8 Proz. des trockenen Organs.

Mehrere Kaninchenlebern Nr. 88 lieferten 50,59 g Pulver und 6,66 Toluolextrakt = 11,7 Proz. des trockenen Organs.

Zwei Hundelebern von jungen Tieren desselben Wurfes:

a) Nr. 91 lieferte 16,39 g Pulver und 5,27 Toluolextrakt = 23,9 Proz. des trockenen Organs.

b) Nr. 90 lieferte 16,37 g Pulver und 46,08(!) Toluolextrakt = 74 Proz. des trockenen Organs.

[Tier b) zeigte intra vitam zwar völlig normales Verhalten, seine Leber war aber sehr stark verfettet, nach dem Durchspülen erschien sie fast rein weiß.]

Die so gewonnenen, mit Toluol extrahierten Organpulver enthalten noch (oft sehr reichlich) alkohollösliche Stoffe, die teilweise

in Wasser, völlig dagegen in mit Toluol versetztem Aceton löslich sind und den mit Wasser emulgierten Pulvern einen oft sehr widerwärtigen Geruch erteilen; die wässerigen Auszüge der Alkoholextrakte reagieren sauer, was sich auch darin kundgibt, daß mit 0,05 Proz. Soda hergestellte Pulver-Emulsionen so gut wie neutral reagieren, wiewohl die Sodalösung an sich sehr deutlich auf Lackmus reagiert; dieses Verhalten kommt auch bei der später zu besprechenden Dialyse zum Ausdrucke. — Die alkohollöslichen Stoffe lassen sich aus dem trockenen Pulver in derselben Weise entfernen, wie die Toluolextraktion erfolgte, ohne daß Eiweißkörper und Fermente geschädigt zu werden brauchten. Es zeigte sich, daß diese in völlig trockenem Zustande selbst längere Einwirkung von Alkohol vertragen, ohne denaturiert zu werden, ähnlich wie Eiweißkörper bei Abwesenheit von Wasser sich weit über ihren Koagulationspunkt erwärmen lassen, ohne unlöslich zu werden. So kann man beispielsweise ein Blutserumpulver völlig mit Toluol und Alkohol auf dem Filter auswaschen und erhält schließlich ein weißes vollkommen in Wasser lösliches Pulver. Die weitaus labileren Eiweißkörper der Organe erfordern aber absolute Abwesenheit von Wasser, um ihre Integrität zu bewahren, was bei offenem Hantieren mit Alkohol, der Wasser aus der Luft anzieht, nicht zu erzielen ist; deshalb büßen mit 96 proz. Alkohol gemahlene und ausgewaschene Pulver etwas von ihrer Löslichkeit ein. Das Aceton, welches ja weniger energisch Eiweiß fällt, ist da weitaus vorzuziehen, doch wird man auch hierbei zweckmäßig die Anwesenheit von Wasserspuren zu vermeiden haben.

Am besten erfolgt die Extraktion mit Alkohol oder Aceton in der Weise, daß man die Pulver nochmals in der Farbenmühle mit Toluol anreibt und die Emulsion in viel wasserfreien Alkohol oder entwässertes Aceton eingießt, in verschlossener Flasche einige Zeit extrahieren läßt, hierauf rasch abnutscht, mit Toluol nachspült und diesen Vorgang entsprechend oft wiederholt[1]).

Die Alkoholextrakte sind meist viel massiger als die Toluolextrakte (beispielsweise gab ein mit Toluol extrahiertes Rindernierenpulver noch ein Drittel seines Gewichtes an Alkohol ab); sie sind tief dunkelbraun gefärbt und oft von widerlich-ranzigem Geruche, sie lösen sich in Wasser zu eigentümlichen, oft gänzlich unfiltrierbaren Emulsionen, in anderen Fällen dagegen lassen sich gut wässerige Auszüge in der Wärme herstellen, indem sich an

[1]) Erst nach wochenlangem Einwirken des Alkohols scheint eine Verminderung der Löslichkeit der Plasmaeiweißkörper einzutreten.

der Oberfläche des Wassers braune, schmierige Massen abscheiden. — Die extrahierten Organpulver dagegen sind nun von großer Reinheit und verhalten sich in gelungenen Fällen bezüglich der Eiweißkörper und Fermente ebenso wie die bloß mit Toluol extrahierten. Mit Wasser jetzt hergestellte Emulsionen sind geruchlos, filtrieren noch besser und schneller als es nach der Toluolextraktion der Fall war und liefern nurmehr wenig gefärbte Filtrate.

In dieser Form stellen die Organpulver die fast reinen nur noch mit Salzen vermengten Organproteïne dar und dürften für die meisten Untersuchungen ein zweckmäßigeres, haltbareres Ausgangsmaterial bilden als es die frischen Organe sind; von den mehr oder minder nebensächlichen Begleitstoffen befreit, dürften gleiche Gewichtsmengen dieser Pulver sowohl bezüglich ihres Eiweißbestandes als bezüglich ihrer Wirkung als vergleichbare reagierende Massen der Organe angesehen werden können. Mit wässerigen Flüssigkeiten in der Farbenmühle verrieben, geben diese Organpulver Emulsionen, welche nur sehr langsam einen Bodensatz absetzen und daher bequem mit Pipetten oder Zylindern dosiert werden können. Diese Emulsionen lassen sich durch Filtration, Zentrifuge oder Salzfällung gut fraktionieren.

Damit ist eine quantitative Fraktionierung der Organbestandteile angebahnt, welche die einzelnen Fraktionen in unverändertem — sozusagen in überlebendem — Zustande rein zu isolieren gestattet. Eine solche Fraktionierung wird nicht nur dem durch Orgelmeister[1]) begonnenen Studium der toxikologischen Veränderungen der Organe im chemischen Sinne und dem Studium des physiologischen Bestandes der Organe dienlich sein, sie erleichtert auch das Studium und die Darstellung der Organfermente, wie aus den beiden folgenden Arbeiten bezüglich des harnsäurezerstörenden Fermentes hervorgeht; sie wird aber möglicherweise auch den Weg ebnen, in den organotherapeutischen Bestrebungen einen experimentell-quantitativen Standpunkt zu gewinnen, sowohl hinsichtlich der Darstellung extra corpus wirksamer Präparate als auch hinsichtlich der Wirkung derselben nach Einverleibung in den lebenden Tierkörper. Dies letztere vermutlich deshalb, weil man nicht mehr mit unreinen labilen Gemischen, sondern mit mehr oder weniger wohl charakterisierten haltbaren Körpern wird arbeiten können und weil sich die einzelnen Fraktionen, wie ich vorwegnehme, durch Dialyse so weit in Lösung

---

[1]) Zeitschr. f. experim. Path. u. Therap. 3, 219 (1906).

bringen lassen, daß ihre intravenöse Applikation möglich geworden ist.

Es ist naheliegend, die Methode auch auf pflanzliche Organe (z. B. Samen) und Bakterien anzuwenden. Der im besonderen einzuschlagende Weg der Fraktionierung wird sich natürlich an das jeweilig vorliegende Problem anzupassen haben, wie es in den beiden folgenden Arbeiten geschehen ist, die einerseits die Darstellung des harnsäurezerstörenden Fermentes, andererseits die Isolierung der Zersetzungsprodukte der Harnsäure durch das Organferment zum Zwecke hatten.

Im folgenden will ich nur kurz und vorläufig darüber berichten, in welcher Weise sich die erhaltenen gereinigten Organemulsionen gegen Filtration, Dialyse, Zentrifugieren und Salzfällung verhalten.

Sind die Suspensionen mit (physiologischer) Salzlösung hergestellt worden, so lassen sie sich gut filtrieren und die Filterrückstände quantitativ auswaschen; wegen der leichten Koagulierbarkeit der Plasma-Eiweißkörper muß man die Filtration in der Kälte vornehmen, um das ganze Plasma zu gewinnen. Ein geringer Zusatz an Alkali (0,05 Proz. Soda) verhindert zwar die spontane Koagulation der Plasmaeiweiße, er erschwert aber auch sehr die Filtration. Jedenfalls ist es aber möglich, durch Filtration quantitativ alle in Salzlösung löslichen Organeiweiße zu gewinnen und als wohl charakterisierte Fraktion abzutrennen.

Auch bei Alkaligegenwart kann man aber die Plasmagewinnung beschleunigen, wenn man die Suspensionen auf Salzkonzentrationen bringt, welche die Plasmaeiweiße noch nicht zu fällen imstande sind; hierbei ist aber zu bemerken, daß sich durch längere Einwirkung selbst so schwacher Sodalösungen, wie ich sie benutzt habe (0,05 Proz.), die Fällungsgrenzen des Plasmas gegenüber den einzelnen Salzlösungen nach unten verschieben, das Plasma wird leichter fällbar; natives Plasma fällt beispielsweise noch nicht mit dem gleichen Volumen einer Kaliumacetatlösung in Wasser (zu gleichen Teilen), mit Alkali behandeltes dagegen schon mit $^1/_2$ ev. $^1/_4$ Volumen. Jedenfalls gelingt es auch durch Salzfällung, das Plasma völlig abzutrennen.

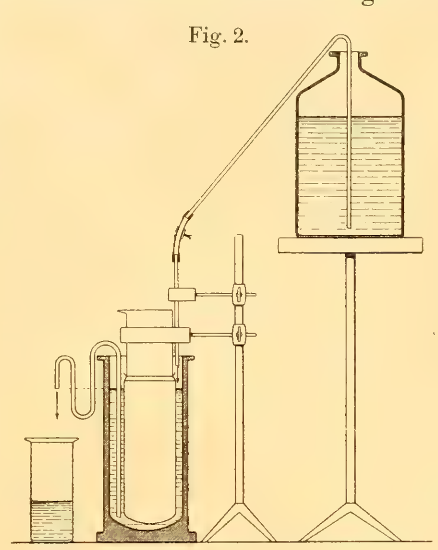
Werden die Suspensionen nicht filtriert, sondern zentrifugiert, so erhält man nicht klare, sondern opaleszente, in dicker Schicht ganz undurchsichtige Zentrifugate, welche neben dem Plasma offenbar noch einen zweiten nur opaleszent löslichen Eiweißkörper enthalten. Dieser Eiweißkörper unterscheidet sich durch

seine Fällungsgrenzen vom Plasma und namentlich auch dadurch, daß er mit Calciumchlorid bereits bei Konzentrationen quantitativ ausfällt, welche das Plasma intakt lassen und eine Salzwirkung ausschließen. Die opaleszenten Zentrifugate filtrieren unverändert durch Papier, von Kieselgur wird dagegen der fragliche Körper zurückgehalten und läßt sich aus dieser wiedergewinnen; ebenso bleibt er bei der Filtration der Gesamtemulsion auf dem Filter. Es hat sich gezeigt, daß dieser Eiweißkörper nur sehr langsam in Lösung geht und daß selbst bei Anwendung von schwachem Alkali eine quantitative Gewinnung nicht möglich ist; viel bessere Resultate werden aber erzielt, wenn man die Suspensionen der Organpulver zunächst einer mehrtägigen Dialyse gegen 0,05 proz. Sodalösung unterwirft und hinterher in der Wärme bei 37° die Extraktion vornimmt. Die Dialyse wird mit den Emulsionen in toto bzw. mit den Rückständen von der Plasmadarstellung vorgenommen.

Als Dialysatoren benutze ich sogenannte Fischblasenkondome, die angeblich aus dem Blinddarm von Schafen hergestellt werden. Sie sind ein ausgezeichnetes Material, welches wegen seiner Dünnheit und unten geschlossenen Form sehr rasch dialysieren läßt. Die Prüfung auf Dichtigkeit erfordert einen kleinen Kunstgriff, weil das Material so dünn ist, daß beim Anfüllen mit Wasser infolge des starken Druckes nach einiger Zeit auch aus dichten Schläuchen an einzelnen dünneren Stellen Wasser herauszusickern beginnt; bei dieser gewöhnlichen Art der Prüfung findet man nur sehr selten ein brauchbares Stück. Da die Schläuche aber während der Dialyse keinen solchen Druck auszuhalten haben, nehme ich die Prüfung so vor, daß die in Wasser eintauchenden Schläuche mit Lackmuslösung gefüllt werden und längere Zeit sich selbst überlassen bleiben; an wirklich undichten Stellen tritt der kolloide Farbstoff heraus und die Färbung der Außenflüssigkeit zeigt die Unbrauchbarkeit des Stückes an. Auf diese Weise geprüft, zeigen sich selbst unter den geringeren Sorten die meisten Stücke brauchbar. — Um mit möglichst wenig Flüssigkeit auszukommen, den Fortgang der Dialyse bequemer beurteilen zu können und auch die Verarbeitung der Dialysationsflüssigkeit zu erleichtern, werden die Glaszylinder, in welchen die Schläuche bis an den Boden tauchen, so eng gewählt, daß diese eben Platz haben ohne die Wände zu berühren; hierdurch wird die Außenflüssigkeit auf etwa $^1/_5$ des Volumens des Schlauchinhaltes reduziert und der Wechsel der Flüssigkeit erfolgt auch bei langsamem Zuflusse relativ rasch. Der Abfluß wird durch eine dreimal U-förmig gebogene Röhre, die auf den

Boden des Zylinders reicht, so geregelt, daß immer genau so viel Flüssigkeit vom Boden des Zylinders abläuft als oben zufließt (vgl. Fig. 2); das freie Ende der Abflußröhre läßt sich durch Ansetzen von Schlauchstücken verlängern, so daß das Flüssigkeitsniveau im Zylinder in beliebiger Weise reguliert werden kann. Der Zufluß braucht nicht rasch zu erfolgen — etwa zwei Liter in 24 Stunden genügen —, er wird durch eine Bunsenklemme reguliert. Bei diesem Vorgehen wird halbgesättigte Ammonsulfatlösung in 24 Stunden vollständig sulfatfrei und Menschenharn chlorfrei. Als bestes Antiseptikum hat sich Toluol bewährt, welches reichlich auf die Flüssigkeit innerhalb und außerhalb des Schlauches aufgeschüttet wird. Alle anderen Zusätze, Chloroform, Thymol, Fluornatrium, sind weniger zweckmäßig. Das Toluol hat zwar den Nachteil, daß es sich mit nativen Organaufschwemmungen sehr leicht emulgiert und die Filtration dadurch sehr erschwert, bei Emulsionen aber, die aus gut extrahierten Pulvern hergestellt sind, macht sich dieser Übelstand kaum bemerkbar.

Fig. 2.



Die Dialyse erfolgt gegen eine 0,05 proz. Sodalösung; diese Konzentration verhindert die spontane Plasmakoagulation und hat sich für das harnsäurelösende Ferment als notwendiger konservierender Zusatz erwiesen, bei Zimmertemperatur dürfte hierdurch wohl auch die Autolyse hintangehalten werden; wenigstens wurde ein autolytischer Zerfall niemals beobachtet.

Werden Suspensionen aus Pulvern dialysiert, die nur mit Toluol extrahiert waren, so bemerkt man zunächst reichlichen Übergang von Farbstoff und sauren Produkten; die abfließende Flüssigkeit ist deutlich gefärbt und reagiert anfangs viel weniger alkalisch als die zufließende. Nach 24 Stunden ist die Emulsion meist salz- und farbstofffrei, sie vergrößert aber noch einige Tage hindurch ihr Volumen. Im Anfang setzt die Emulsion einen Bodensatz ab, wird derselbe aber einige Male aufgewirbelt (etwa durch Anblasen

eines auf den Grund des Dialysators herabgelassenen dünnen Schlauches), so setzt sich später kaum mehr etwas ab und die Flüssigkeit im Dialysator wird deutlich transparenter; doch ist der schließliche Grad der erreichten Lösung bei verschiedenen Organen recht verschieden. Suspensionen aus Pulvern, die auch mit Aceton (oder Alkohol) extrahiert wurden, geben bei der Dialyse sehr wenig bis gar keinen Farbstoff ab. Es ist wahrscheinlich, daß der wasserlösliche Teil des Alkoholextraktes bei der Dialyse von nur mit Toluol behandelten Pulvern entfernt wird.

Wenn die Dialyse etwa fünf bis sechs Tage im Gange gewesen ist, zeigen die Suspensionen folgende Eigenschaften. Beim Kochen tritt keine Koagulation, vielmehr eine Aufhellung ein. Mit Essigsäure fallen die Suspensionen nicht mehr, sondern lösen sich im Überschusse der Säure fast zur Wasserklarheit. Alkohol fällt nicht, dagegen geben Mineralsäuren auch bei Abwesenheit von Salzen flockige Niederschläge. Im Filtrate davon sind keine Salze, dagegen ein mit Phosphorwolframsäure fällbarer Körper in geringer Menge vorhanden, der durch Dialyse niemals völlig entfernt werden konnte. Die Suspensionen enthalten z. B. das Harnsäure zerstörende Ferment in ungeschwächtem Zustande und sind monatelang selbst bei Zimmertemperatur unverändert haltbar.

Bei der Filtration erhält man ein gelblich gefärbtes Plasma, welches andere Fällungsgrenzen gegen Salzlösungen aufweist als „natives Plasma“ und mehr Eiweiß enthält als dieses. Durch die Zentrifuge erhält man opaleszente Lösungen, die Rückstände lassen sich durch Behandlung mit derselben Sodalösung bei Bruttemperatur und nachträgliches Zentrifugieren eiweißfrei waschen.

Die schließlich zurückbleibenden unlöslichen Rückstände werden von Pepsin, aber auch von Säure allein gelöst, lösen sich dagegen nicht beim Kochen (enthalten also nicht nennenswert leimgebendes Gewebe). — Die Zentrifugate zeigen die schon früher besprochenen Eigenschaften, sie lassen sich außerdem ohne Schaden intravenös injizieren. Erzeugung indifferenter Niederschläge klärt sie nicht und auch bei Salzfällungen niederer Konzentration bleibt die überstehende Flüssigkeit opaleszent. Mit Salzlösungen beginnen diese dialysierten Emulsionen schon bei sehr niederer Konzentration auszufallen, z. B. mit $^1/_{10}$ bis $^1/_{20}$ Volumen einer Kaliumacetatlösung (in Wasser *āā*). Die Fällungen filtrieren sehr leicht, verteilen sich in Carbonatlösung wieder zu ganz homogenen Emulsionen; durch Umfällen erhält man bald farblose und eiweißfreie Filtrate. Die Fällungen lassen sich dann nach kurzer Dialyse

durch die Zentrifuge in die beiden eben besprochenen Fraktionen sondern.

Zum Schlusse teile ich einige Zahlen mit, welche die quantitativen Verhältnisse bei der Dialyse der gereinigten Organemulsionen betreffen, bzw. die Unschädlichkeit der Alkoholextraktion dartun und gebe ein Schema der Organbilanzierung.

Rindernierenpulver XI B mit Toluol gemahlen und in der Wärme gewaschen.

Das Pulver wiegt . . . . 16,55 g
das Toluolextrakt . . . . 1,5 g
der Trockenrückstand einer 1 g Pulver entsprechenden Emulsionsmenge nach der Dialyse wiegt (28 Proz. dialys. Substanzen) . . 0,72 g
davon sind 0,117 Salze der Dialysationsflüssigkeit (0,05 Proz. Soda und 0,4 Proz. NaFl).
Der unlösliche Rückstand nach dem Zentrifugieren wiegt . . . . . 0,17 g

Versuch Nr. 90. Hundeleberpulver mit Toluol extrahiert.

Das Pulver wird mit 0,05 Proz. Soda vermahlen, nach 24 Stunden wird ein Teil filtriert und vom Filtrat ein Volumen, entsprechend 1 g Pulver, abgemessen; dieses Volumen enthält 0,1055 g Eiweiß. Das Filtrat fällt nicht mit dem gleichen Volumen Acetatlösung. Ein anderer Teil der Emulsion wird nach dreitägiger Dialyse gegen 0,05 Proz. Soda ebenso behandelt. Das Filtrat trübt sich schon bei Zusatz von $^1/_{10}$ Vol. Acetatlösung und fällt flockig mit $^1/_5$ Vol. Das einem Gramm Pulver entsprechende Volumen des Filtrates enthält 0,2074 g Eiweiß. Nach dreitägiger Dialyse gegen Wasser enthält das Filtrat der Suspension bloß 0,0495 g Eiweiß auf 1 g Pulver, während die Ausgangssuspension nach neuntägigem Stehen im Filtrat nurmehr 0,0899 g Eiweiß auf 1 g Pulver enthält. Die Differenz ist bei Zimmertemperatur unlöslich geworden.

Rinderleberpulver Nr. I, Versuch 1 bis 3.

1. Das Pulver war von Mai bis Oktober 1906 unter Toluol gestanden, 2 g dieses Pulvers enthielten 0,2831 in 0,8 proz. NaCl-Lösung lösliches Eiweiß.

2. Ein Teil des Pulvers wurde durch 2 × 24 Stunden dreimal mit Alkohol extrahiert, hierauf wog die Probe 13,8; der Rückstand der Alkohollösung 1,9. — 2 g dieses Pulvers, welche demnach $\frac{2 \times 1,9}{13,8} + 2 = 2,277$ g des bloß mit Toluol extrahierten entsprechen, enthalten 0,3253 in physiologischer NaCl-Lösung lösliches Eiweiß. Aus Versuch 1 berechnet sich für 2,277 g Pulver ein Gehalt an löslichem Eiweiß von 0,3173 g.

Eine quantitative Fraktionierung der Organe wird übersichtlich durch folgende Schemata dargestellt. Die chemische Charakterisierung der einzelnen Fraktionen, vor allem mit Bezug auf die Eiweißkörper, wird demnächst mitgeteilt werden. Die Anwendung der Methode auf pathologisch-pharmakologische Probleme ist im Gange.

Schema I.

Organ, ausgespült, bei 30° getrocknet, mit Toluol vermahlen und erschöpft

- I. Toluolextrakt
- Rückstand mit Alkohol erschöpft
  - II. Alkoholextrakt
  - Rückstand mit 0,8 proz. Kochsalzlösung erschöpft (Filtration)
    - III. Filtrat „Plasma“
    - Rückstand mit 0,05 proz. Sodalösung erschöpft (Filtration)
      - IV. Filtrat
      - Rückstand (in Säuren und Laugen lösliche Eiweißkörper)

Schema II.

Mit Toluol und Alkohol extrahiertes Organpulver mit 0,8 proz. Na Cl-Lösung vermahlen und auf dem Filter eiweißfrei gewaschen

- „Plasma“
- Rückstand mit 0,05 proz. Soda vermahlen und gegen dieselbe Flüssigkeit dialysiert, dann zentrifugiert
  - Opaleszentlösliche Organfraktion zusammen mit Fraktion IV des vorhergehenden Schemas
  - Rückstand

Schema III.

Mit Toluol und Alkohol extrahiertes Organpulver mit 0,05 proz. Sodalösung vermahlen und gegen dieselbe Flüssigkeit dialysiert. Suspension gegen 0,05 proz. Sodalösung dialysiert, hierauf mit der gerade ausreichenden Menge Kaliumacetat gefällt und filtriert, Umfällen bis das Filtrat eiweißfrei ist

- Filtrat-Plasma + Fraktion IV des Schema I
- Rückstand nach Dialyse zentrifugiert und durch Zentrifugieren völlig ausgewaschen
  - V. Zentrifugat opaleszent
  - VI. Rückstand

XIX.

Über Eigenschaften und Darstellung des harnsäurezerstörenden Fermentes der Rinderniere und Hundeleber.

Von Priv.-Doz. Dr. **W. Wiechowski**, Assistenten am Institute und Priv.-Doz. Dr. **H. Wiener**.

Aus dem pharmakologischen Institute der deutschen Universität Prag.

(Ausgeführt mit Unterstützung der Gesellschaft zur Förderung deutscher Wissenschaft, Kunst und Literatur in Böhmen.)

1.

Über eine fermentative Zersetzung von Harnsäure durch überlebende tierische Organe wurde zuerst von Stokvis[1]), später von A. Chassevant und Ch. Richet[2]), Ascoli[3]) und M. Jacoby[4]) berichtet. Gleichzeitig mit dem letzteren hat der eine von uns (Wiener[5]) eine ausführlichere Arbeit hierüber veröffentlicht und seither zahlreiche, allerdings wenig befriedigende Versuche zur Darstellung dieses Fermentes unternommen[6]). Wir haben dann den Gegenstand neuerdings gemeinsam mittels einer auch zu anderen Zwecken verwendbaren Methode in Angriff genommen, welche

---

[1]) Bijdragen tot de Physiologie van het acidum uricum 1859. Nederl. Tijdschrift voor Geneeskunde. Zit. nach Salkowski, Berl. klin. Wochenschr. 1900, S. 436.

[2]) Des ferments solubles uréopoïétiques du foie. Compt. rend. de la S. de Biolog. 1897, p. 743.

[3]) Über die Stellung der Leber im Nucleïnstoffwechsel, Pflügers Arch. 72, 340 (1898).

[4]) Über die Oxydationsfermente der Leber. Virchows Archiv **157**, 235 (1899).

[5]) Über Zersetzung und Bildung der Harnsäure usw. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **42**, 375 (1899).

[6]) Über Harnsäurezersetzung durch Organferment. Zentralbl. f. Physiol. **18**, 22 (1905).

der eine von uns ausgearbeitet hat (Wiechowski[1]). Mittlerweile teilte A. Schittenhelm[2]) mit, daß es ihm gelungen sei, mittels der von M. Jacoby und Rosell benutzten Uranylacetatfällungsmethode gut wirksame Fermentlösungen darzustellen.

Die Angaben der Autoren sind folgende:

1. Das harnsäurezerstörende Ferment wurde gefunden: beim Rinde in Nieren (Wiener, l. c.), Muskeln (Wiener, l. c. und Burian[3]), Leber (Burian, l. c., und Schittenhelm[4]) und vielleicht im Knochenmark (Schittenhelm, ebenda), nicht dagegen in Milz, Lunge und Darm (Schittenhelm, ebenda); beim Hunde in der Leber (Stokvis, l. c., Chassevant und Richet, l. c., Ascoli, l. c., M. Jacoby, l. c., Wiener, l. c.), nicht dagegen in den Nieren (Wiener, l. c.); ferner in der Schweineleber und Pferdeniere (Wiener, l. c.). Neuestens fand M. Almagia[5]) das Ferment im Pferdeorganismus sehr verbreitet.

Nach unseren gegenwärtigen Untersuchungen können wir diese Reihe dahin fortsetzen, daß Kaninchenleber, aber nicht Kaninchenniere imstande ist, Harnsäure zu zerstören.

2. Das Ferment findet sich in Leberfiltraten (die Tierspezies ist nicht genannt) (Chassevant und Ch. Richet, l. c.) und geht aus mit Sand verriebenem Rindernierengewebe bei alkalischer Reaktion in die Uranylacetatfällung über; aus dem abfiltrierten Niederschlage läßt es sich durch Digerieren mit 0,2 proz. Sodalösung und Filtration isolieren; es ist nicht dialysabel und nicht kochbeständig[6]) (Schittenhelm, l. c.). Almagia, l. c., fand es nicht in Organpreßsäften.

3. Schließlich finden sich noch stark von einander abweichende Angaben über die Produkte dieser fermentativen Harnsäurezersetzung (vgl. hierüber die folgende Arbeit).

Die Wirkungsweise und die Eigenschaften des Fermentes sind noch nicht studiert und auch das Problem der Darstellung scheint nicht endgültig[7]) gelöst zu sein. Das Ziel der nachfolgenden

---

[1]) Die ausführliche Beschreibung der Methode siehe in der vorhergehenden Arbeit.

[2]) Über das uricolytische Ferment, Zeitschr. f. physiol. Chem. 45, 161 (1905).

[3]) Das. 43, 497 u. 532.

[4]) Das. 45, 121 (1905).

[5]) Diese Beiträge 7, 459.

[6]) Jacoby, l. c., fand das Ferment aus Hundeleber partiell coctostabil (vgl. hierzu später S. 263).

[7]) Wenigstens gibt Schittenhelm an, daß es nicht immer gelingt, wirksame Fermentlösungen darzustellen.

Untersuchungen war es, ein verläßliches und ergiebiges Verfahren zur Darstellung dieses Fermentes zu finden. Dieser Zweck machte es notwendig, zunächst die Wirkung der benutzten Maßnahmen auf die Fermentleistung kennen zu lernen. Die Gesamtheit der in dieser Richtung gemachten Erfahrungen gestattet es, die eigenartigen Eigenschaften des Harnsäurefermentes näher zu kennzeichnen.

2.

Als Ausgangsmaterial für unsere Versuche dienten nicht die frischen Organe, sondern Organpulver, welche durch rasches, wenige Stunden währendes Trocknen der blutfrei gespülten, überlebenden Organe in dünnster Schichte bei 37°, Vermahlen mit Toluol in einer Farbenreibmühle[1]), Abnutschen und Farbstofffreiwaschen mit Toluol auf der Nutsche hergestellt waren. Diese Pulver sind frei von allen toluollöslichen Stoffen (Fett, Lecithin, Farbstoff usw.), die Organzellen sind so gut wie vollständig zertrümmert. Die Eiweißkörper sowie das Ferment sind in unverändertem Zustande konserviert. Aus diesen Pulvern werden jeweils mittels verschiedener Flüssigkeiten gleichfalls in der Farbenmühle Emulsionen oder Suspensionen hergestellt, die so fein sind, daß sie nur sehr langsam einen Bodensatz absetzen und daher mit Maßgefäßen gemessen und verteilt werden könnten. Die Verwendung solcher Pulver (Emulsionen) ermöglicht eine genaue Dosierung und damit (außer einem Vergleich der Wirksamkeit verschiedener Organe und desselben Organes verschiedener Individuen) namentlich auch einen Vergleich vorbehandelter Proben oder einzelner Fraktionen mit dem Ausgangsmaterial innerhalb größerer Zeiträume.

Da wir nicht darauf ausgingen, wirksame Extrakte schlechtweg darzustellen, sondern die gesamte wirksame Potenz in haltbarem Zustande möglichst isolieren und gleichzeitig die Eigenschaften des Fermentes studieren wollten, waren wir genötigt, alle Maßnahmen zunächst auf eine allfällige Beeinflussung des Fermentes zu prüfen, und in allen Fraktionen zu verschiedenen Zeiten die Wirksamkeit zu bestimmen. Dies konnte nur durch Vergleich mit der Wirksamkeit des Ausgangsmaterials geschehen. Hierbei wurden die (auf trockenes Pulver bezogen stets gleichen) Mengen so niedrig gewählt, daß durch die Vergleichsprobe des Ausgangsmaterials eine ein für allemal willkürlich festgesetzte Harnsäuredosis in bestimmter, stets gleicher Zeit bei gleicher Temperatur bis auf einen

[1]) Vgl. die vorhergehende Arbeit, S. 235.

geringfügigen Rest zersetzt wurde. Diese untere Grenze war meist durch 1 g Pulver gegeben. Nur auf diese Weise konnten selbst geringe Änderungen der Wirksamkeit erkannt werden, die bei Verwendung größerer als zur Zersetzung gerade ausreichender Fermentmengen der Beobachtung leicht entgehen konnten.

Es liegt nahe, diese willkürlich gewählte Zersetzungsintensität des Pulvers überhaupt als Wirkungseinheit anzunehmen und einer für alle Organe aller Tiere gültigen quantitativen Fermentbestimmung zugrunde zu legen. Abgesehen davon aber, daß, wie unten in Kapitel 3 gezeigt werden wird, die Wirkungsweise des Fermentes noch eingehenden Studiums bedarf, können die wie oben erhaltenen Pulver verschiedener Organe (homo- und heterologer) deshalb nicht ohne weiteres miteinander verglichen werden, weil sie, abgesehen von Salzen, in wechselnder relativer Menge noch reichlich alkohollösliche Stoffe enthalten, welche mit dem Reingewicht (der reagierenden Masse) der Organe nichts zu tun haben. Für den vorliegenden Zweck kommen diese Bedenken natürlich nicht in Betracht und sind vielleicht für orientierende Bestimmungen überhaupt belanglos, wenigstens haben uns einige Vorversuche in dieser Richtung gezeigt, daß die so dargestellten Pulver normaler homo- wie heterologer Organe derselben und verschiedener Tiere, nach der genannten Methode geprüft, eine durchaus gleich intensive Wirkung entfalten. Doch müssen diese Untersuchungen noch weiter geführt werden, ehe es möglich sein wird, diese Fermentbestimmungsmethode, wie wir es anstreben, zur Lösung rein pharmakologischer Fragen zu verwerten.

Die Anordnung des Zersetzungsversuches (welcher das eben besprochene Wirkungsmaß darstellt) war die von Wiener, l. c., benutzte: Vierstündiges Schütteln der Proben mit einer frisch bereiteten Lösung von 0,2 g Natrium uricum (Schuchardt) in höchstens zur Hälfte gefüllten Literflaschen bei 40° auf der Schüttelmaschine und Bestimmung der restlichen Harnsäure in toto (nicht aliquoter Teile) nach Entfernung der Eiweißkörper durch Hitzekoagulation (bei eben deutlich essigsaurer Reaktion) nach dem Verfahren von Ludwig-Salkowski[1]).

Die verwendete Menge von 0,2 g Natr. uric. entsprach in Kontrollanalysen verschiedener Präparate 0,12 bis 0,14 g Harnsäure; der Harnsäurewert wurde für jedes Präparat bestimmt. Wurde für mehrere gleichzeitig zu verarbeitende Proben eine Stammlösung aus größeren Mengen Natr. uric. hergestellt, so wurde eine gleichgroße Kontrollprobe gleichzeitig geschüttelt. Solche Kontrollver-

---

[1]) Die auskristallisierte Harnsäure wurde auf getrockneten Papierfiltern gewaschen und mit diesen gewogen. Die Filter nehmen hierbei an Gewicht ab, so daß die dritte Dezimale unsicher wird. Daher geben wir unsere Zahlen bloß in Zentigrammen an, wobei die zweite Dezimale korrigiert ist, Differenzen um 0,01 sind deshalb meist von der Beurteilung ausgeschlossen.

suche ohne Ferment ergaben gleichmäßige Resultate, ob die Lösung sofort verarbeitet wurde oder vorher vier Stunden bei Zimmertemperatur gestanden, oder vier Stunden bei 40° mit 0,05 proz. Sodalösung geschüttelt worden war, in guter Übereinstimmung mit Resultaten, die ohne Fällung, durch direktes Auskristallisieren der Harnsäure auf Zusatz von Salzsäure erhalten wurden. Z. B.:

Versuch Nr. 87. (3, 9 und 10) am 24. IV. 1906.

3. 100 ccm Natr. uric.-Lösung + 1 ccm 5 proz. Sodalösung + Toluol 4 Stunden bei 40° geschüttelt, gefunden (Ludwig-Salkowski): 0,137 g $\bar{u}$.

9. 100 ccm Natr. uric.-Lösung 4 Stunden bei Zimmertemperatur gestanden, gefunden (Ludwig-Salkowski): 0,138 g $\bar{u}$.

10. 20 ccm Natr. uric.-Lösung sofort mit HCl zur Kristallisation eingedampft, gefunden $\bar{u}$ 0,0274, also in 100 ccm: 0,137 g $\bar{u}$.

Diese Feststellung erscheint uns von Wichtigkeit in Anbetracht dessen, daß sich insbesondere bei alkalischer Reaktion Harnsäurelösungen leicht spontan zersetzen. Schittenhelm (l. c.) leitet durch seine 0,2 proz. Soda enthaltenden Lösungen, denen er die Harnsäure in Normallauge gelöst zusetzt, 4 Tage bei 43° Luft, wobei er angibt, schon an und für sich ohne Ferment eine geringe Zersetzung beobachtet zu haben. Wir haben diese Anordnung mit der unseren verglichen:

Versuch Nr. 110, 5. bis 9. VII. 1906.

0,2 Natr. uric. = 0,14 $\bar{u}$ werden in etwa 200 ccm 0,2 proz. Sodalösung gelöst, auf dem Wasserbade wird bei 40 bis 42° 4 Tage Luft durch die Lösung geleitet. In der Nacht zum 6. VII. war die Probe zur Trockene eingedampft; daher wurde von nun an alle 24 Stunden etwas Wasser nach gegossen. Gefunden $\bar{u}$: 0,00 g.

Um die eventuell schädliche durch Wasserverdunstung bedingte Konzentrationszunahme an Alkali hintanzuhalten (es ist nicht ersichtlich, ob Schittenhelm dieses Moment berücksichtigt hat), wurde in dem folgenden Versuche feuchte Luft zum Durchleiten verwendet.

Versuch Nr. 113, 11. bis 15. VII. 1906.

0,2 Natr. uric. = 0,14 $\bar{u}$ werden in etwa 200 ccm 0,2 proz. Sodalösung gelöst. Die durch die Lösung streichende Luft wird zunächst durch eine im selben Wasserbade befindliche mit Wasser beschickte Waschflasche geleitet. Temperatur 40 bis 42°. Dauer 4 Tage. Gefunden $\bar{u}$: 0,04 g.

Hiernach ist die Harnsäurezersetzung durch Luft in 0,2 proz. Soda bei 42° in 4 Tagen nicht unbeträchtlich.

Viel geringer ist die Harnsäurezersetzung durch Luft während dieser Zeit in neutraler Reaktion.

Versuch Nr. 33, 23. bis 27. V. 1906.

Etwa 200 ccm gekochtes Nierenfiltrat (blutfrei gespülte Rinderniere, fein verteilt, mit dem doppelten Gewicht Wasser 24 Stunden im Eisschrank

extrahiert) mit einer Lösung von 0,2 Natr. uric. (= 0,13 $\bar{u}$) versetzt. Luftdurchleiten bei 40° im Thermostaten. Dauer 4 Tage. Gefunden: 0,09 g $\bar{u}$.

Nach dem Ausfalle dieser Versuche erscheint unsere Anordnung des Zersetzungsversuches zweckmäßiger als die Schittenhelmsche.

3. Die Wirkungsweise des Fermentes.

1. Im Hinblick darauf, daß Schittenhelm die Wirkung des Fermentes beim Luftdurchleiten, wir beim Schütteln mit Luft, andere wie Chassevant und Richet und Subkow[1]) unter mehr oder minder anaëroben Bedingungen (bloßes Stehenlassen bei 40° mit oder ohne Paraffinbedeckung) studiert haben, sei hier zunächst eine Versuchsreihe angeführt, welche die Wirkungsintensität zu vergleichen gestattet: a) beim Schütteln mit Luft, b) beim Schütteln ohne Luft, c) beim Luftdurchleiten, d) beim bloßen Stehen — allemal während 4 Stunden bei 40°.

Versuch Nr. 69. (4) (als Kontrolle).

R. N. P. XI[2]). 5 g mit 0,08 Proz. Thymol und 0,025 Proz. Soda gemahlen. Volumen = 200. 40 ccm = 1 g. 40 ccm der Emulsion, 48 Stunden gegen 0,08 Proz. Thymol und 0,025 Proz. Soda dialysiert, zersetzen von 0,2 Natr. uric. (= 0,14 g $\bar{u}$) beim 4stündigen Schütteln bei 40°: 0,14 g $\bar{u}$.

Versuch Nr. 70. (10) 13. bis 19. XII. 1905.

R. N. P. XI. 10 g mit 0,8 Proz. Thymol und 0,025 Proz. Soda gemahlen ad 200. 20 ccm Emulsion = 1 g. 19. XII. 1905. 20 ccm zersetzen von 0,2 Natr. uric. (= 0,14 g $\bar{u}$) bei 4stündigem Stehen bei 40°: 0,05 g $\bar{u}$.

Versuch Nr. 76. (8 und 9) 13. I. bis 28. I. 1906 (9 als Kontrolle).

R. N. P. XI. B. (Das Toluolextrakt ist in diesem Falle nicht abgetrennt worden.) 10 g mit 0,05 proz. chloroformges. Sodalösung gemahlen ad 200. 20 ccm = 1 g. 120 ccm 3 Tage gegen dieselbe Flüssigkeit dialysiert. Endvolumen 300. 50 = 1 g.

8. 50 ccm mit 0,2 Natr. uric. (= 0,14 g $\bar{u}$) 4 Stunden bei 40° geschüttelt; die Flasche war auf 18 mm Hg evakuiert, dreimal mit Kohlensäure gefüllt und immer wieder evakuiert worden. Das Vakuum hatte bis zum Schlusse des Versuches bestanden. Zersetzt wurde 0,02 g $\bar{u}$.

9. 50 ccm mit 0,2 Natr. uric. (= 0,14 g $\bar{u}$) 4 Stunden bei 40° geschüttelt, zersetzen: 0,13 g $\bar{u}$.

Versuch Nr. 1 und 2. Februar 1905. 1. als Kontrolle R. N. P. III[3]).

---

[1]) Über den Einfluß der Alkalien usw. Diss. Moskau 1903 (russisch), zitiert nach: Jahresb. f. Tierchem. 33, 873.

[2]) Hier, wie in der Folge, bedeutet R. N. P. und H. L. P. nach der eingangs geschilderten Methode dargestelltes Rindernieren- bzw. Hundeleberpulver, die römische Zahl die Nummer des Präparates.

[3]) Dieses Pulver ist nicht mit Toluol vermahlen worden, sonst aber ebenso hergestellt wie die übrigen Pulver.

1. 2,5 g mit 0,2 Natr. uric. (= 0,13 g *u*) 4 Stunden bei 40° geschüttelt, zersetzen: 0,11 g *ū*.

2. 2,5 g mit 0,2 Natr. uric. (= 0,13 g *u*) 4 Stunden bei 40° Luft durchgeleitet, zersetzen: 0,06 g *ū*.

Die größte Intensität entfaltet das Ferment also beim Schütteln mit Luft, viel geringer ist seine Wirksamkeit, wenn durch die Lösungen Luft geleitet wird, oder wenn die Lösungen sich selbst überlassen bleiben.

Bei Abwesenheit von Luft wirkt das Ferment auch beim Schütteln gar nicht.

2. Den Einfluß von Temperatur und Reaktion auf die Fermentwirkung erweisen folgende Versuche:

Versuch Nr. 20 als Kontrolle, 17. III. 1905.

R. N. P. V (ohne Anwendung der Farbenreibmühle nacheinander mit Toluol, Alkohol und physiologischer Kochsalzlösung extrahiert). 2,5 g mit Glaspulver in Salzlösung verrieben, 1 Stunde bei 40° geschüttelt, 24 Stunden Eisschrank, dann zentrifugiert. Zentrifugat und Rückstand mit je 0,2 g Natr. uric. (= 0,13 g *ū*) 4 Stunden bei 40° geschüttelt. Das Zentrifugat zersetzt 0,02 g *ū*. Rückstand zersetzt alles (kein Niederschlag).

Versuch Nr. 26, 4. bis 9. V. 1905.

4. V. 2,5 g R. N. P. V mit 0,2 g Natr. uric. (= 0,13 g *ū*) Wasser und Glaspulver verrieben, bis 8. V. Eisschrank, dann 3,5 Stunden bei Zimmertemperatur geschüttelt; am 9. V. zentrifugiert. Das Zentrifugat enthält 0,02 g *ū*, der Rückstand enthält 0,00 g *ū*.

Versuch Nr. 12, A und C, 22. III. 1905. (A als Kontrolle.)

R. N. P. IV (ohne Anwendung der Farbenmühle nacheinander mit Toluol und Alkohol extrahiert).

A: 2,5 g mit physiologischer Kochsalzlösung, C: mit 0,05 Proz. Essigsäure 1,5 Stunden bei Zimmertemperatur geschüttelt, dann zu jeder Probe 0,2 g Natr. uric. (= 0,13 g *ū*) und 4 Stunden bei 40° geschüttelt. A zersetzte: 0,13 g. C zersetzte: 0,02 g *ū*.

Die Harnsäurezersetzung findet also in vollem Umfange auch bei neutraler Reaktion und Zimmertemperatur statt, die saure Reaktion verhindert dagegen die Zersetzung vollständig. Das Temperaturoptimum bzw. der Einfluß der Temperatur auf die Geschwindigkeit und den Umfang der Zersetzung bleibt noch zu ermitteln.

3. Die Bedeutung der Einwirkungszeit für den Umfang der Zersetzung beleuchtet der folgende orientierende Versuch (er steht im Einklange mit dem Versuche Nr. 26 auf S. 257).

Versuch Nr. 70, (1) 13. XII. 1905.

R. N. P. XI. 10 g mit 0,1 Proz. Thymol und 0,025 Proz. Soda gemahlen ad 200; 20 ccm = 1 g.

20 ccm Emulsion mit 0,4 Natr. uric. (= 0,28 g *ū*) 7 Stunden bei 40° geschüttelt, dann 12 Stunden im Thermostaten bei 40° und 8 Stunden bei Zimmertemperatur, zersetzen 0,27 g *ū*.

Versuch Nr. 75, 3. I. 1906 (als Kontrolle).

R. N. P. XI. 4 g mit 0,05 Proz. Soda gemahlen ad 100; Toluolzusatz; 25 ccm = 1 g. 25 ccm mit 0,2 Natr. uric. (= 0,14 g *ū*) 4 Stunden bei 40° geschüttelt, zersetzen: 0,13 g *ū*.

Mit der Dauer der Einwirkung (Schütteln mit Luft) wächst sonach der Umfang der Zersetzung, ob wirklich, wie in diesem Versuche, immer proportional, läßt sich nach diesem vereinzelten Versuche nicht entscheiden.

4. Die Menge des Fermentes, bei gleicher Einwirkungsdauer, scheint die Harnsäurezersetzung in verschiedenem Maße zu beeinflussen, je nachdem es sich um gut oder weniger gut wirksame Fermente handelt und je nach der Menge der zur Verfügung stehenden Harnsäure.

Versuch Nr. 84. (1, 2, 3, 5, 8, 9).

H. L. P. IV. Am 20. III. 1906 20 g mit 0,05 proz. Sodalösung und 0,08 Proz. Thymol gemahlen. Dialyse gegen dieselbe Flüssigkeit. 21. III. bis 26. III. 1906 Volumen: 800; 40 ccm = 1 g.

1. 26. III. 1906, 40 ccm zersetzen von 0,2 Natr. uric. (= 0,14 g *ū*): 0,12 g *ū*.

2. 27. III. 1906, 50 ccm zersetzen von 0,2 Natr. uric. (= 0,14 g *ū*) alles (kein Niederschlag).

3. 26. IV. 1906, 50 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,1356 g *ū*: 0,13 g *ū*.

5. 26. IV. 1906, 100 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,2732 g *ū*: 0,26 g *ū*.

8. 27. IV. 1906, 150 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,4350 g *ū*: 0,39 g *ū*.

9. 27. IV. 1906, 200 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,5800 g *ū*: 0,51 g *ū*.

Alle Proben mit etwas Toluol 4 Stunden bei 40° geschüttelt.

Die doppelte, dreifache und vierfache Fermentmenge mit dem homologen Multiplum Harnsäure gleich lange geschüttelt, zerlegt also fast genau die doppelte, drei- und vierfache Harnsäuremenge.

Ganz anders ist das Verhalten, wenn man nur die Fermentmenge variiert, die Menge der zugesetzten Harnsäure aber nicht ändert, hier zeigt sich das proportionale Anwachsen der Zersetzungsgröße mit der Fermentmenge nicht, wiewohl bei den Anfangsgliedern dieser Reihe häufig noch genügend Harnsäure vorhanden ist, um hierzu Gelegenheit zu bieten. Außerdem weisen bei dieser Versuchsanordnung die einzelnen Präparate individuelle Unter-

schiede auf, indem das Anwachsen der Zersetzungsgröße unter sonst gleichen Bedingungen ein verschiedenes ist.

Versuch Nr. 111, 9. bis 10. VII. 1906.

R. N. P. XIII. Viermal mit Aceton extrahiert.

5 g mit 0,4 Proz. Fluornatrium in 0,05 Proz. Soda gemahlen. Volumen 150; 30 ccm = 1 g.

15 ccm = 0,5 g zersetzen von Natr. uric. = 0,139 g: 0,06 g *ū*.

30 ccm = 1,0 g zersetzen von Natr. uric. = 0,139 g: 0,10 g *ū*.

Versuch Nr. 87. (1, 2, 4.)

1. IV. 1906. 10 g H. L. P. VI mit 0,05 proz. Sodalösung und 0,08 Proz. Thymol gemahlen. Gegen dieselbe Flüssigkeit dialysiert (3. bis 6. IV. 1906). Volumen 500; 1 g = 50 ccm.

1. 6. IV. 1906, 50 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,10 g *ū*.
2. 6. IV. 1906, 100 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,14 g *ū*.
4. 24. IV. 1906, 75 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,12 g *ū*.

Versuch Nr. 86. (1, 2, 3, 4.)

23. III. 1906. 20 g H. L. P. mit 0,05 proz. Sodalösung und 0,08 Proz. Thymol gemahlen. 30. III. bis 5. IV. 1906 Dialyse gegen dieselbe Flüssigkeit. Volumen 1000, 50 ccm = 1 g.

1. 6. IV. 1906, 25 ccm = 0,5 g zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,05 g *ū*.
2. 6. IV. 1906, 50 ccm = 1,0 g zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,08 g *ū*.
3. 7. IV. 1906, 100 ccm = 2,0 g zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,09 g *ū*.
4. 7. IV. 1906, 150 ccm = 3,0 g zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,11 g *ū*.

Versuch Nr. 67, 6. XI. 1905.

20 g R. N. P. X mit 0,05 Proz. Soda, Fluorid und Toluol viermal in der Wärme extrahiert. Extrakte durch Zentrifugieren gewonnen.

$^1/_3$ des letzten Extraktes zersetzt von Natr. uric. = 0,12 g *ū*: 0,10 g *ū*.

$^1/_3$ des Rückstandes zersetzt von Natr. uric. = 0,12 g *ū*: 0,07 g *ū*.

$^1/_{20}$ der vereinigten Extrakte = 1 g zersetzen von Natr. uric. = 0,12 g *ū*: 0,06 g *ū*.

$^2/_{20}$ der vereinigten Extrakte = 2 g zersetzen von Natr. uric. = 0,12 g *ū*: 0,08 g *ū*.

$^3/_{20}$ der vereinigten Extrakte = 3 g zersetzen von Natr. uric. = 0,12 g *ū*: 0,09 g *ū*.

Versuch Nr. 103. II. (1 und 2.)

5 g H. L. P. X mit 0,05 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol gemahlen, durch Umfällen mit $^1/_4$ Vol. Kaliumacetatlösung in Wasser (*aa*) vom Plasma befreit (vgl. weiter unten), gegen Soda-Thymol dialysiert (26. VI. bis 7. VII. 1906). Volumen 265; 53 ccm = 1 g. Die Emulsion wird filtriert.

8. VII. 1906, 53 ccm Filtrat = 1 g zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,09 g *ū*.

8. VII. 1906, 100 ccm Filtrat = 2 g zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,11 g *ū*.

In den ersten beiden Versuchen dieser Reihe, die mit Präparaten von guter Wirksamkeit angestellt sind, zeigt sich ein schnelleres Anwachsen der Zersetzungsgröße mit der Fermentmenge als bei den letzten drei Versuchen, deren Ausgangspräparate weniger wirksam waren. Jedenfalls aber ist bei dieser Anordnung in allen Versuchen (vielleicht nur mit Ausnahme des ersten, wo noch relativ sehr viel unzersetzte Harnsäure für die zweite Zersetzung übrig war) auch nicht annäherungsweise ein proportionales Anwachsen der Wirkung mit der Fermentmenge zu beobachten. Wenn man bedenkt, daß dieses aber sicher der Fall wäre, wenn die Zersetzung in der Weise ausgeführt würde, daß man das Anfangsglied der Reihen zwei-, drei- und viermal in ebenso vielen Gefäßen gleichzeitig angesetzt hätte und nach Ablauf des 4stündigen Schüttelns den Inhalt dieser Gefäße vereinigt hätte, so kommt man zu dem Schlusse, daß die Zersetzungsgröße auch mit der Menge der vorhandenen Harnsäure zunimmt. Für diese Annahme scheint uns auch der folgende Versuch zu sprechen.

Versuch Nr. 87. (6) (vgl. S. 255).

4. 24. IV. 1906, 75 ccm = 1,5 g zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,12 g.

6. 75 ccm = 1,5 g zersetzen von Natr. uric. = 0,28 g *ū*: 0,16 g *ū*.

Auch die folgende Beobachtung spricht dafür: Wenn aus einer Emulsion mit gerade nicht vollständig zersetzender Wirksamkeit durch Zentrifugieren das Ferment nicht vollständig fraktioniert wird, so ist die Summe der Zersetzungsgrößen in beiden Fraktionen (geprüft mit der vollen Harnsäureeinheitsdosis) fast immer größer als die Zersetzungsgröße des Ausgangsmaterials.

Wenn dieser Schluß richtig wäre, so müßten gut wirksame Fermente mit weniger als der verwendeten Einheitsdosis auch verhältnismäßig weniger Harnsäure zersetzen, und die Tätigkeit des Fermentes wäre dann durch das Bestreben charakterisiert, in den Lösungen einen bestimmten geringen Konzentrationsgrad an Harnsäure zu erzielen. Solche Versuche haben wir noch nicht angestellt. Jedenfalls hätte dieses Verhalten aber nach beiden Seiten enge Grenzen; denn es zersetzen — in der Regel sogar — die Präparate zu etwa 2 g Ausgangsmaterial die Harnsäureeinzeldosis restlos und es läßt sich dies bei allen Präparaten durch die Steigerung der Fermentmenge erzielen; andererseits ist die Mehrleistung im Versuch 87 (6) gegenüber (4) viel zu gering, um die Harnsäurekonzentration auf das Niveau von 4 herabzudrücken. — Diese Verhältnisse bedürfen noch eingehenden Studiums; gegenwärtig

läßt sich nur allgemein dahin resumieren, daß der Umfang der Zersetzung in gleichen Zeiten in gewissem Grade nicht nur von der Fermentmenge, sondern auch von der verfügbaren Harnsäuremenge abhängt.

5. Auf die Frage, ob das Ferment infolge seiner Tätigkeit erschöpft wird bzw. zugrunde geht, wirft der folgende Versuch einiges Licht.

Versuch Nr. 26.

4. V. bis 7. V. 1905. 2,5 g R. N. P. V.[1]), welches mit Toluol, Alkohol und physiologischer Kochsalzlösung extrahiert ist (die gleiche Dosis hatte am 17. III. 1905 die Einzeldosis *ū* restlos zersetzt), werden am 4. V. mit einer Lösung von 0,2 Natr. uric. und Glaspulver verrieben; bis 5. V. im Eisschrank; am 5. V. 4 Stunden bei 40° geschüttelt; bis 6. V. im Eisschrank. 6. V. zentrifugiert. Zentrifugat und Rückstand mit je 0,2 g Natr. uric. (= 0,13 g *ū*) wie gewöhnlich bei 40° behandelt: das Zentrifugat zersetzte 0,02 g *ū*; der Rückstand restlos.

Auch der Versuch 70 (1) auf S. 253 läßt sich in demselben Sinne deuten: das Ferment vermag nach vorausgegangener einmaliger Zersetzung noch ein zweites Mal dasselbe zu leisten. Doch wäre es verfrüht, aus diesen wenigen Daten den Schluß zu ziehen, daß das Ferment durch seine Tätigkeit keine Änderung seiner Wirkungsintensität erfährt.

6. In welcher Weise die zum Schütteln verwendete Luftmenge und die Konzentration an Harnsäure die Zersetzung beeinflussen, haben wir speziell nicht untersucht. Es hatte sich aber gelegentlich gezeigt, daß in zu vollen Gefäßen die Zersetzung geringer war; wir haben daher grundsätzlich nur zur Hälfte gefüllte, etwa einen Liter fassende Flaschen verwendet, welche bei Vergleichsversuchen stets annähernd gleich gefüllt wurden, so daß die Konzentration an Harnsäure in den meisten Versuchen als gleich angenommen werden kann.

7. Das Produkt der Harnsäurezersetzung bei unserer Versuchsanordnung ist, wie der eine von uns (Wiechowski) gefunden hat, Allantoin (vgl. dazu die folgende Arbeit).

8. Während die Maßnahmen, welche das Ferment als solches treffen (schädigen oder zerstören), im nächsten Kapitel besprochen werden, sollen hier zum Schlusse noch einige meist bloß orientierende Versuche Platz finden, die den Einfluß gewisser Stoffe auf die Tätigkeit des Fermentes betreffen.

---

[1]) Bei diesem Pulver wurde die Farbenreibmühle nicht angewendet.

a) Zunächst ist die Feststellung nicht unwichtig, daß weder ein Überschuß von Harnsäure noch anscheinend ihres Zersetzungsproduktes (Allantoin) die Tätigkeit des Fermentes beeinträchtigt. Für die Harnsäure ist das schon durch Versuch 87 (6), S. 256, bewiesen, für das Allantoin gilt der folgende Versuch.

Versuch Nr. 87 (8), 24. IV. 1906. H. L. P. VI. Vgl. S. 255.

75 ccm Emulsion (= 1,5 g) zersetzen von Natr. uric. = 0,137 g *ū*: 0,120 g *ū*.

75 ccm Emulsion + 0,2 Allantoin zersetzen von Natr. uric. = 0,137 g *ū*: 0,112 g *ū*.

b) Die Anwesenheit von Rinderserum stört die Fermentation der Harnsäure durch Rindernierenferment nicht.

Versuch 70 (7), 17. XII. 1905. R. N. P. XI A. Vgl. S. 253.

20 ccm Emulsion = 1 g + 50 ccm Rinderserum zersetzen Natr. uric. = 0,137 g *ū* restlos.

Als Kontrolle diene Versuch Nr. 75, 2. I. 1906. R. N. P. XI A.

4 g mit 0,05 Proz. Soda gemahlen ad 100, Toluol, 25 ccm = 1 g.

25 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,137 g *ū*: 0,13 g *ū*.

Die zersetzende Fähigkeit des Rinderserums selbst ist in der Menge von 50 ccm, wie ein Kontrollversuch zeigte, sehr gering.

c) Milz, Hoden und Lunge eines entbluteten Huhnes, welche mit 0,05 Proz. Karbonat und Toluol 11 Tage im Eisschrank gestanden hatten, hemmten die Zersetzung durch R. N. P. nicht — in diesem Versuche war eine 0,14 *ū* restlos zersetzende Pulvermenge von je 3 g verwendet worden, so daß immerhin eine geringe Hemmung der Zersetzung der Beobachtung entgangen sein kann. Auch die lange Dauer zwischen Entnahme der Organe und dem Versuche beeinträchtigt seine Beweiskraft, so daß vorderhand das wichtige Verhalten der Vogelorgane zu dem harnsäurezersetzenden Fermente der Säugetierorgane noch nicht klar ist.

d) Das Serum eines Kaninchens, welches mit steigenden Dosen eines wirksamen Zentrifugates aus H. L.-Emulsion behandelt worden war, hemmte die Harnsäurezersetzung durch das Immunisierungsmaterial nicht.

Versuche Nr. 78 (3) und Nr. 81.

22. I. 1906. H. L. P. II (mit Toluol gemahlen, das Toluolextrakt aber nicht entfernt) 43 g gemahlen mit 0,4 Proz. NaFl und 0,05 Proz. Soda; dann Dialyse, zunächst gegen dieselbe Flüssigkeit, später gegen 0,05 proz. Sodalösung mit 0,08 Proz. Thymol. Dialyse vom 26. I. bis 5. II. 1906. Volumen 1000. 23,2 ccm = 1 g; 1 ccm = 0,043 g trockene Leber. Ein Teil zentrifugiert.

Nr. 78 (3). 50 ccm Zentrifugat zersetzen Natr. uric. = 0,14 g *ū* restlos.

Kaninchen Nr. 2 erhält am 9. II. 2 ccm, 13. II. 3 ccm, 24. II. 5 ccm, 3. III. 8 ccm Zentrifugat, zusammen 18 ccm (= 0,77 g trockene Leber), jedes-

mal in eine Ohrvene. Das Gewicht des Tieres sank von 1860 auf 1420. Eiweiß im Harn zumeist deutlich. Am 6. III. 1906 verblutet. Serum 17 ccm.

Nr. 81, 7. III. 1906.

50 ccm Zentrifugat + 16 ccm Immunserum zersetzen Natr. uric. = 0,14 g *ū* restlos.

e) Die Gegenwart von Kaninchenleberfiltrat („-Plasma") hemmt die Zersetzung der Harnsäure durch R. N.-Ferment (vgl. dazu auch S. 272).

Versuch Nr. 82 (5), 6. bis 30. IV. 1906. R. N. P. XII A.

6. III. bis 18. III. 1906. 20 g gemahlen mit 0,4 Proz. NaFl und 0,05 Proz. Soda. Dialyse. — Durch Umfällen mit $^1/_2$ Vol. Kaliumacetat in Wasser (*aa*) plasmafrei. Dialyse vom 14. III. bis 18. III. Volumen 550; 27 ccm = 1 g.

30 ccm Emulsion zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,13 g *ū*.

30 ccm + Plasma von einer Kaninchenleber zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,06 g *ū*.

f) Ein Einfluß der antiseptischen Zusätze 0,2 bis 0,8 Proz. NaFl, 0,08 Proz. Thymol oder Toluol, bzw. Chloroform im Überschuß ist niemals beobachtet worden.

g) Die Anwesenheit von 1 Proz. Salicylsäure stört die Zersetzung nicht.

Versuch Nr. 78. (1, 2.) H. L. P. II. Mit Toluol gemahlen aber nicht extrahiert. Dialysierte Emulsion 50 ccm = 2 g.

Januar 1906. 50 ccm zersetzen Natr. uric. = 0,14 g *ū* restlos.

50 ccm mit 1 Proz. Salicylsäure in 0,05 Proz. Soda gelöst, zersetzen Natr. uric. = 0,14 g *ū* restlos.

h) Dagegen hemmt ein Überschuss an Salzen, insbesondere wie gelegentlich beobachtet wurde, ein höherer Prozentgehalt an Kochsalz die Fermentation der Harnsäure. Der folgende Versuch zeigt, daß ein Gehalt von etwa 2 Proz. Kalium acet. ebenfalls hemmend wirkt, ein Salz, welches (vgl. S. 280) das Ferment selbst unbeeinflußt läßt.

Versuch Nr. 104, I (1). H. L. P. X. 26. VI. 1906.

5 g mit 0,8 Proz. NaCl, 0,08 Proz. Thymol (ohne Alkali) und 20 ccm Kalium acet. in Wasser *aa* ad 500 gemahlen. Volumen 250; 50 ccm = 1 g.

27. VI. 1906. 50 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,07 g *ū*.

Versuch Nr. 102 (als Kontrolle). H. L. P. X. 25. VI. 1906.

10 g mit 0,8 Proz. NaCl, 0,08 Proz. Thymol, 0,05 Proz. Soda gemahlen. Volumen 200; 20 ccm = 1 g.

26. VI. 1906. 20 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,11 g *ū*.

i) Von Substanzen, welche in höheren Konzentrationen (vgl. weiter unten S. 273 und 280) das Ferment abschwächen oder zerstören, haben Harnstoff, Äthyl- und Methylalkohol zu 0,5 Proz. keinen oder einen kaum merkbaren Einfluß auf die

Fermenttätigkeit. Dagegen findet bei Anwesenheit von irgend größeren Mengen Äthylalkohol keine Zersetzung der Harnsäure statt, wie gelegentlich beobachtet wurde, als einmal versehentlich stark alkoholhaltiges Toluol als Antiseptikum benutzt wurde.

Versuch Nr. 82 (6), 30. IV. 1906, und (8, 9), 4. V. 1906. R. N. P. XII A. Vgl. S. 271.

6. 30 ccm Emulsion zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,13 g.

8. 30 ccm Emulsion + Natr. uric. = 0,14 g *ū* + dem gleichen Volumen 1 proz. *ū*-Lösung zersetzen 0,13 g.

9. 30 ccm Emulsion + Natr. uric. = 0,14 g *ū* + dem gleichen Volumen 1 proz. Methylalkohol zersetzen 0,12 g.

Versuch Nr. 84, 11, 12, 8. V. 1906. H. L. P. IV. Vgl. S. 263.

50 ccm Emulsion zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,13 g *ū*.

50 ccm Emulsion + Natr. uric. = 0,14 g *ū* + dem gleichen Volumen 1 proz. Äthylalkohol zersetzen 0,12 g *ū*.

Zusammenfassung.

Die Ergebnisse der vorstehenden Versuche, welche, insbesondere was die Gesetzmäßigkeit der Wirkung anlangt, durchaus nicht als abgeschlossen betrachtet werden sollen, lassen sich dahin zusammenfassen: Das harnsäurezerstörende Ferment der Rinderniere und Hundeleber ist eine nur bei schwach alkalischer oder neutraler Reaktion wirkende Oxydase (vgl. M. Jacoby, l. c., welcher die Zersetzung als Oxydation anspricht). Die Zersetzung ist am größten beim Schütteln mit reichlich Luft, sie findet auch bei Zimmertemperatur statt. Das homologe Serum hindert sie nicht. Die jeweilige Größe der Zersetzung ist nicht nur abhängig von der **Fermentmenge** und der Wirkungs**zeit**, sondern innerhalb gewisser Grenzen auch von der **Menge** der zur Verfügung stehenden **Harnsäure.** Es ist daher notwendig, für vergleichende Versuche über die Wirksamkeit oder Menge des Fermentes nicht nur die Zeit, sondern auch die zuzusetzende Harnsäuremenge gleich zu wählen.

Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen erweist sich die tierische Harnsäureoxydase als äußerst wirksam. Die größten beobachteten Zersetzungen bei unserer Anordnung waren: in Versuch 84 (9) (S. 254) **0,51** g *ū* durch 4 g H. L. P. — Versuch 68, II **0,56** g *ū* durch 4 g R. N. P. — Versuch 82, (2) **1,4** g *ū* durch 10 g R. N. P. — Versuch 83, 3 **1,2** g *ū* durch 17 g H. L. P.

Bei Annahme einer durchschnittlichen Zersetzungsgröße von 0,12 g Harnsäure pro Gramm Organpulver und 4 stündlicher Einwirkung würden für den (wahrscheinlichen?) Fall des proportionalen

Wachsens der Wirkung mit Fermentmenge und Wirkungszeit: die etwa 16 g Trockenpulver liefernde Leber eines kleinen Hundes in 24 Stunden etwa 11 g *ū*, die ungefähr 100 g Trockenpulver liefernden beiden Nieren eines erwachsenen Rindes etwa 70 g *ū* in 24 Stunden zu zersetzen vermögen.

Ob diese Harnsäureoxydase in vivo tätig ist, bzw. ob sie, in den Körper eingeführt, auch dort ihre Tätigkeit entfaltet, ob sie imstande ist, auch andere in vivo oxydable Körper zu zerstören, welche Beziehungen zwischen ihr und den anderen tierischen Oxydasen bestehen: über alle diese Fragen ließen sich wohl auf Grund der vorhandenen Literatur und des eben Mitgeteilten Vermutungen aussprechen, doch muß die Entscheidung weiterem experimentellem Studium vorbehalten bleiben.

4. Wirkung verschiedener physikalischer und chemischer Eingriffe auf das Ferment.

1. Einfluß der Temperatur. Aus allen Versuchen, die wir gemacht haben, geht hervor, daß die frischen, ausgespülten Organe durch das wenige Stunden dauernde Trocknen bei 37 bis 40° in ihrer Wirksamkeit nicht geschädigt werden; sind die Organe einmal trocken, so werden sie selbst durch tagelanges Verweilen bei dieser Temperatur nicht merklich beeinflußt. Ein länger dauerndes Erhitzen des trockenen Pulvers auf 100° vernichtet hingegen das Ferment anscheinend vollständig.

Versuch Nr. 74. R. N. P. IX A.

1 g zersetzte am 2. I. 1906 Natr. uric. = 0,14 g *ū* restlos [Versuch 73 (7)]. 1 g vom 2. I. bis 3. I. 1906 bei 100° gestanden, dann unter Zusatz von 0,05 Proz. Soda und Toluol mit Natr. uric. = 0,14 g *ū* digeriert, am 4. I. geschüttelt, zersetzte augenscheinlich gar nicht. Die Bestimmung ging kurz vor der Wägung verloren.

Anders ist das Verhalten des Fermentes gegen höhere Temperaturen bei Gegenwart von Wasser; hierbei spielt die Reaktion und die Natur des zugesetzten Antiseptikums eine Rolle, auch scheinen hier Unterschiede zu bestehen zwischen Rinderniere und Hundeleber — aber auch individuelle Unterschiede bei verschiedenen Präparaten von Rinderniere. Im nächsten Absatz wird ausgeführt werden, daß in Gegenwart von Wasser das Ferment nur bei alkalischer Reaktion haltbar ist, bei neutraler dagegen verschieden schnell seine Wirksamkeit einbüßt; dieses Zugrundegehen des Fermentes bei neutraler Reaktion wird durch Erwärmen auf 37° beschleunigt.

Versuch Nr. 17 A und B. R. N. P. IV (ohne Farbenmühle mit Toluol und Alkohol extrahiert).

A. 2,5 g, mit 0,8 proz. Kochsalzlösung 1. IV. 1905 bis 3. IV. 1905 im Brutschrank, zersetzen Natr. uric. = 0,13 g *ū* restlos.

B. 2,5 g, mit 0,8 proz. Kochsalzlösung 1. IV. 1905 bis 3. IV. 1905 im Eisschrank, zersetzen Natr. uric. = 13 g *ū* restlos.

Versuch Nr. 18 A und B. Dasselbe Präparat wie im vorigen Versuch.

A. 2,5 g, mit H_2O und Toluol 4. IV. bis 11. IV. bei 40°, zersetzen von Natr. uric. = 0,13 g *ū*: 0,07 g.

B. 2,5 g, ebenso vom 4. IV. bis 11. IV. im Eisschrank, zersetzen Natr. uric. = 0,13 g *ū* restlos.

Bei schwach alkalischer Reaktion (0,05 Proz. Soda) dagegen ist das Ferment selbst nach achttägigem Aufenthalt bei 37 bis 40° noch voll wirksam.

Versuch Nr. 48 (1, 2, 3). R. N. P. VII (mit Toluol und Rizinusöl extrahiert). 13. VII. bis 22. VII. 1906.

1. 3 g, mit 0,05 Proz. Soda und Toluol 3 × 24 Stunden bei 40°, zersetzen von Natr. uric. = 0,12 g *ū*: 0,09 g *ū*.
2. 3 g, mit 0,05 Proz. Soda und Toluol 4 × 24 Stunden bei 40°, zersetzen von Natr. uric. = 0,12 g *ū*: 0,09 g *ū*.
3. 3 g, mit 0,05 Proz. Soda und Toluol 8 × 24 Stunden bei 40°, zersetzen von Natr. uric. = 0,12 g *ū*: 0,09 g *ū*.

Als Kontrolle: Versuch Nr. 45. 30. VI. 1905. Dasselbe Präparat wie im vorigen Versuch.

3 g zersetzen von Natr. uric. = 0,12 g *ū*: 0,08 g.

Auch sonst haben wir die Erfahrung gemacht, daß man die 0,05 Proz. Soda enthaltenden Emulsionen zwecks schnellerer Extraktion des Fermentes längere Zeit bei 40° halten kann, ohne eine Schädigung wahrzunehmen; der Einfluß des Antiseptikums auf dieses Verhalten wird in Punkt 4 (S. 272) erläutert.

Ob das Ferment höhere als Bluttemperatur dauernd verträgt, ist nicht sicher; der folgende Versuch ist nicht sehr deutlich ausgefallen.

Versuch 73 (7). R. N. P. XI (Kontrolle).

10 g mit 0,025 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol gemahlen und dialysiert. Vol. 300; 30 ccm = 1 g.

2. I. 06. 30 ccm 24 Stunden bei 37 bis 40° gestanden, zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,11 g *ū*.

Versuch 75, 3. R. N. P. XI.

4 g mit 0,05 Proz. Soda ad 100 gemahlen. 25 ccm = 1 g; Toluol.

4. bis 5. I. 1906. 25 ccm 24 Stunden bei 50° zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,10 g *ū*.

In Anbetracht der sicher schädigenden Wirkung des Thymols bei 37° (die Kontrolle zu 73 (7) ergab eine Zersetzung von 0,14)

glauben wir trotz der geringen Differenzen auf eine Herabsetzung der Wirkungsintensität durch 24 stündliches Erwärmen auf 50° schließen zu dürfen.

10 Minuten langes Kochen zerstört das Ferment vollständig.

Versuch Nr. 87 (5, 4). H. L. P. VI. 24. IV. 1906 (vgl. S. 258).

4. 75 ccm Emulsion = 1,5 g zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,12 g.

5. 75 ccm 10 Minuten lang gekocht zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,02 g.

Versuch 84, 7. 27. IV. 1906. H. L. P. IV (vgl. S. 260).

50 ccm Emulsion (= 1,25 g), 10 Minuten gekocht, zersetzen von Natr. uric. = 0,07 g *ū*: 0,01 g.

Als Kontrolle Versuch 84, 3. 26. IV. 1906 (dasselbe Präparat wie im vorigen Versuch).

50 ccm Emulsion (= 1,25 g) zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,14 g.

2. Einfluß der Reaktion. a) Neutrale Reaktion. Wie gesagt, nimmt die Wirksamkeit des Fermentes in alkalifreien Emulsionen bald ab. Langsamer in der Kälte, rascher bei 37°. Die einzelnen Präparate verhalten sich dabei nicht ganz gleichmäßig. Hundeleber ist jedenfalls viel empfindlicher in dieser Richtung als Rinderniere. Vielleicht spielt dabei auch eine vorläufige Extraktion des Pulvers mit Alkohol eine Rolle in dem Sinne, als solche mit Alkohol extrahierte Pulver in nicht mit Alkali versetzten Emulsionen länger wirksam bleiben. Es spricht, wie wir weiter unten sehen werden, manches dafür, daß durch Alkoholextraktion fermentschädigende (wahrscheinlich saure) Produkte entfernt werden.

Versuch Nr. 17 und 18 auf S. 262 zeigt die Haltbarkeit eines alkoholextrahierten Pulvers in neutraler Emulsion bis zu acht Tagen im Eisschrank. Anders verhält sich das folgende Präparat:

Versuch Nr. 49. R. N. P. VII. Mit Toluol und Rizinusöl extrahiert.

3 g 10. bis 18. VII. 1905 mit H_2O im Eisschrank zersetzen von Natr. uric. = 0,12 g *ū*: 0,05 g *ū*.

Als Kontrolle Versuch Nr. 45. 30. VI. 1906 (dasselbe Präparat).

3 g zersetzt von Natr. uric. = 0,12 g *ū*: 0,08 g *ū*.

Dieselbe Schädigung beobachtet man naturgemäß auch, wenn die Pulver mit neutraler Salzlösung gewaschen oder gegen neutrales Wasser dialysiert werden. Daß hierbei das Ferment nicht etwa ausgewaschen wird oder durch die Membran dialysiert, dafür spricht neben weiter unten anzuführenden Versuchen die Unwirksamkeit der gewonnenen Extrakte auf Harnsäure. Auch in dieser Versuchsreihe ist die größere Resistenz von Rinderniere zu beobachten und die individuell verschiedene Empfindlichkeit bei Hundeleberpräparaten.

Versuch Nr. 98, I (1). H. L. P. III.

7,85 g 1. VI. 1906 mit 0,8 proz. Kochsalzlösung + 0,08 Proz. Thymol gemahlen, dann Eisschrank bis 6. VI. 1906. Filtration. Rückstand noch zweimal ebenso behandelt, bis das Filtrat farbstoff- und eiweißfrei ist. 8. VI. bis 11. VI. Dialyse gegen 0,05 proz. Sodalösung mit 0,08 Proz. Thymol. Vol. 350; 50 ccm = 1 g.

50 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,08 g *ū*.

Die gesammelten Filtrate mit dem gleichen Gewicht Kaliumacetat gefällt, die Fällung nach der Dialyse gelöst ad 140; 20 ccm = 1 g.

20 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*, augenscheinlich nichts (die Bestimmung ging kurz vor der Wägung verloren).

Als Kontrolle Versuch Nr. 92, I (1). H. L. P. III.

10 g mit 0,05 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol gemahlen ad 300; 30 ccm = 1 g.

15. V. 1906. 30 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,12 g *ū*.

Versuch Nr. 100, I (1), II (1, 2) und III. Brieshund-Leber 3.

21. V. 1906. 10 g mit 0,8 Proz. NaCl gemahlen. Vol. 500; 50 ccm = 1 g.

I, 1. 250 ccm + 2,5 ccm 5 proz. Sodalösung, Toluol; 50 (= 1 g) ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,10 g *ū*. (Kontrolle.)

II, 1. 250 ccm im Eisschrank filtriert, Toluol. 22. VI. 1906 Rückstand noch einmal mit Kochsalzlösung gemahlen, filtriert und auf dem Filter mit NaCl-Lösung eiweißfrei und mit H_2O chlorfrei gewaschen. 23. VI. 1906 Rückstand mit H_2O gemahlen. Vol. 250; 50 ccm = 1 g.

23. VI. 1906. 50 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,04 g *ū*.

2. Der Rest mit 2 ccm 5 proz. Soda versetzt.

24. VI. 1906. 50 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,04 g *ū*.

III. Die vereinigten Filtrate und Waschwässer von II betragen 700 ccm; 140 ccm = 1 g.

25. VI. 140 Filtrat zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,01 g *ū*.

II, 2 beweist hier gleichzeitig, daß ein durch Alkalimangel unwirksam gewordenes Ferment durch nachträglichen Alkalizusatz nicht aktivierbar ist.

Versuch Nr. 101, I und II. H. L. P. X.

23. VI. 1906. 5 g mit 0,8 Proz. NaCl gemahlen und dann zentrifugiert; der Rückstand viermal ebenso mit Kochsalzlösung und dann viermal mit H_2O behandelt, schließlich im Eisschrank bis 24. VI. filtriert. Rückstand mit H_2O vermahlen. Vol. 250; 50 ccm = 1 g.

I. 24. VI. 1906. 50 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,04 g *ū*.

II. 25. VI. 1906. Die vereinigten trüben Extrakte messen 1000; 200 ccm = 1 g. 200 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,03 g *ū*.

Als Kontrolle Versuch Nr. 102. H. L. P. X.

25. VI. 1906. 10 g mit 0,05 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol gemahlen ad 200; 20 ccm = 1 g.

26. VI. 1906. 20 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,11 g *ū*.

b) Alkalische Reaktion. Mit 0,05 Proz. Soda ist das Ferment dagegen sowohl im Eisschrank als bei Zimmertemperatur haltbar. Dies zeigte sich in allen Versuchen, und ein speziell in

dieser Hinsicht angestellter Versuch von elfwöchentlicher Dauer ergab dasselbe Resultat:

Versuch Nr. 53. R. N. P. VII.

18. VII. 1905. 13 g mit 0,05 Proz. Soda gemahlen ad 435; 100 ccm = 3 g.

23. VII. 1905. 100 zentrifugiert, Rückstand zersetzt von Natr. uric. = 0,12 g $\bar{u}$: 0,12 g $\bar{u}$.

100 ccm bis 2. X. 1905 im Eisschrank filtriert, Rückstand zersetzt von Natr. uric. = 0,12 g $\bar{u}$: 0,11 g $\bar{u}$.

Das Verhalten bei alkalischer Reaktion und höherer Temperatur ist bereits besprochen.

Über den Einfluß höherer Konzentrationen an Karbonat können wir uns nicht endgültig aussprechen, die Versuche sind nicht gleichmäßig ausgefallen.

Versuch Nr. 14. R. N. P. III (ohne Anwendung der Farbenmühle extrahiert mit Toluol, Alkohol und Kochsalzlösung 0,8 Proz.).

28. III. 1905. 2,5 g mit 0,05 Proz. Soda und Toluol zersetzen von Natr. uric. = 0,125 g $\bar{u}$: 0,105 g $\bar{u}$.

Versuch Nr. 15. Dasselbe Präparat A, B.

29. III. 1905. A. 2,5 g, mit 0,1 Proz. Soda und Toluol, nach 12 Stunden Einwirkung im Eisschrank, zersetzten von Natr. uric. = 0,125 g $\bar{u}$: 0,096 g $\bar{u}$.

B. 2,5 g, mit 0,2 Proz. Soda nach 12 Stunden Einwirkung im Eisschrank (Toluol), zersetzen von Natr. uric. = 0,125 g $\bar{u}$: 0,079 g $\bar{u}$.

Versuch Nr. 114, 1, 2, 5, 4. R. N. P. XIII.

5 g mit 0,05 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol gemahlen ad 250; 50 ccm = 1 g.

1. 12. VII. bis 15. VII. 1906. 50 + 2 ccm 5 proz. Soda, bei 30° gestanden, zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$: 0,11 g $\bar{u}$.

2. 12. VII. bis 15. VII. 1906. 50 ccm, ohne Zusatz bei 30° gestanden, zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$: 0,11 g $\bar{u}$.

4. 12. VII. bis 15. VII. 1906. 50 + 2 ccm 5 proz. Sodalösung bei Zimmertemperatur gestanden, zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$: 0,12 g $\bar{u}$.

5. 12. VII. bis 15. VII. 1906. 50 ccm, ohne Zusatz bei Zimmertemperatur gestanden, zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$: 0,12 g $\bar{u}$.

Während in Versuch 14 eine steigende Schädigung mit der Steigerung der Sodakonzentration bis auf 0,2 Proz. selbst in der Kälte deutlich ist, bleibt in Versuch 114 das Ferment sowohl in der Wärme als bei Zimmertemperatur mit 0,2 Proz. Soda nach vier Tagen ebenso wirksam wie mit 0,05 Proz. Soda.

Nun ist aber Versuch 14 mit einem vollständig mit Toluol, Alkohol und Salzlösung extrahierten Pulver unter Toluolzusatz, Versuch 114 unter Thymolzusatz mit einem bloß mit Toluol extrahierten Pulver angestellt worden, und es ist daher sehr wohl möglich, daß in Versuch 114 alkalibindende Substanzen, die in Versuch 14 entfernt waren, die Alkaleszenz herabgesetzt haben. Vielleicht

haben wir es aber auch hier mit ähnlichen individuellen Verschiedenheiten zu tun, wie sie, wie oben mitgeteilt, das Verhalten des Fermentes in neutralen Flüssigkeiten beherrschen. Daß die Annahme des Vorhandenseins saurer Produkte in den Organpulvern nicht unbegründet ist, wird in dem folgenden Abschnitte ersichtlich werden.

Auf eine Schädigung durch Konzentrationszunahme an Soda läßt sich vielleicht auch das folgende Versuchsresultat beziehen:

Durch Eintrocknen einer wirksamen, 0,05 Proz. Soda enthaltenden Fermentlösung bei 30° ging deren Wirksamkeit vollständig verloren. (Allerdings läßt sich nicht entscheiden, welchen Anteil daran das Thymol hat, welches, wie weiter unten gezeigt wird, in der Wärme das Ferment etwas zu schädigen imstande ist.)

Versuch Nr. 98, I. H. L. P. III (vgl. früher S. 264).

7,8 g mit NaCl-Lösung gewaschen, dann gegen 0,05 proz. Sodalösung dialysiert. Vol. 350; 50 ccm = 1 g.

100 Filtrat. 15. VI. 1906. Zersetzt Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$ restlos.

120 Filtrat mit dem gleichen Gewicht Kaliumacetat gefällt, filtriert, Rückstand dialysiert und getrocknet (15 bis 30°), wieder gelöst 21. VI. 1906, zersetzt von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$: 0,03 g $\bar{u}$.

(Daß das Kaliumacetat unschädlich ist und das Ferment niederschlägt, geht aus weiter unten besprochenen Versuchen hervor.)

Ganz anders als Karbonat verhält sich Natronlauge. Dieselbe zerstört zu 0,1 Proz. das Ferment in der Kälte schon in kurzer Zeit.

Versuch Nr. 7. R. N. P. III (ohne Anwendung der Farbenmühle mit Toluol und Alkohol extrahiert).

2,5 g zuerst mit 0,8 proz. NaCl-Lösung auf der Zentrifuge eiweißfrei gewaschen: A. Hierauf mit $\frac{N}{40}$-NaOH auf der Zentrifuge ebenfalls eiweißfrei gewaschen: B. Ungelöster Rückstand: C.

A zersetzt von Natr. uric. = 0,125 g $\bar{u}$: 0,015 g $\bar{u}$.
B nach dem Neutralisieren von Natr. uric. = 0,125 g $\bar{u}$: 0,032 g $\bar{u}$.
C nach dem Neutralisieren von Natr. uric. = 0,125 g $\bar{u}$: 0,030 g $\bar{u}$.

Kontrolle: Versuch Nr. 8 (dasselbe Präparat).

2,5 g mit 0,8 proz. NaCl-Lösung auf der Zentrifuge eiweißfrei gewaschen. A Centrifugat, B Rückstand.

A zersetzt von Natr. uric. = 0,125 g $\bar{u}$: 0,024 g $\bar{u}$.
B zersetzt von Natr. uric. = 0,125 g $\bar{u}$: 0,119 g $\bar{u}$.

c) Saure Reaktion. Es ist oben gezeigt worden, daß die fermentative Zersetzung der Harnsäure schon bei schwach saurer Reaktion nicht mehr stattfindet. Der folgende Versuch beweist weiter, daß das Ferment selbst bereits durch kurz dauernde Einwirkung schwacher Säure geschädigt wird.

Versuch Nr. 42. R. N. P. VI (mit Toluol und Alkohol extrahiert). 8. VI. 1905.

2,0 g mit 0,05 Proz. Soda (Chloroform gesättigt) gemahlen, dann 3 Stunden bei 40° geschüttelt, zentrifugiert.

Der Rückstand zersetzt Natr. uric. = 0,094 g ū restlos.

Das Zentrifugat mit 0,2 Proz. Essigsäure gefällt und die Fällung zentrifugiert, einmal mit Wasser gewaschen, hierauf in 0,05 proz. Sodalösung verteilt.

Essigsäurefällung zersetzt von Natr. uric. = 0,094 g ū: 0,065 g ū.

Essigsäurezentrifugat zersetzt von Natr. uric. = 0,094 g ū: 0,023 g ū.

Als Kontrolle: Versuch Nr. 41. Dasselbe Präparat wie im vorigen Versuch. 7. VI. 1905.

2,0 g mit 0,05 Proz. Soda, 0,8 Proz. NaCl (Chloroform gesättigt) gemahlen und zentrifugiert. Zentrifugat sowie Rückstand zersetzen je Natr. uric. = 0,125 g ū restlos.

Durch dieses Verhalten gegen Säure ist das Harnsäureferment deutlich vom autolytischen Fermente unterschieden [s. Wiener, Zentralbl. f. Phys. XII, Nr. 11, 1905].

3. Einfluß der Extraktion der Organpulver mit verschiedenen Mitteln (Alkohol, Aceton, Dialyse, Salzlösungen) auf das Ferment. Unsere mit Toluol extrahierten Organpulver geben noch an Alkohol reichlich Substanzen ab, die, zum Teil in Wasser, vollständig in Aceton löslich sind. Es wäre natürlich von größtem Vorteile, diese Substanzen von vornherein zu entfernen, da sie, oft in bedeutender, aber individuell schwankender Menge vorhanden, eine quantitative Vergleichung selbst der homologen Organe der gleichen Tierart erschweren. Durch ihre Entfernung wird die Reinheit und vielleicht auch die Wirkungsfähigkeit der Pulver erhöht. Den Einfluß solcher Extraktionen auf das Ferment zeigen die folgenden Versuche.

Versuch Nr. 1. R. N. P. III (dargestellt am 23. II. 1905). Toluolextraktion.

2,47 g zersetzen von Natr. uric. = 0,125 g ū: 0,106 g ū.

Versuch Nr. 2 (dasselbe Präparat).

2,47 g mit 96 Proz. Alkohol in der Kälte, dann mit Toluol gewaschen, getrocknet, zersetzen von Natr. uric. = 0,125 g ū: 0,114 g ū.

Versuch Nr. 6 (dasselbe Präparat).

2,5 g 24 Stunden unter Alkohol im Eisschrank, dann abgesaugt, mit Toluol gespült, getrocknet, zersetzen von Natr. uric. = 0,125 g ū: 0,110 g ū.

Versuch Nr. 8. Der ganze Rest desselben Präparates wird mit Alkohol und Toluol abwechselnd extrahiert.

2,5 g des extrahierten Pulvers werden auf der Zentrifuge mit 0,8 proz. NaCl gewaschen.

Zentrifugat zersetzt von Natr. uric. = 0,125 g ū: 0,024 g ū.

Rückstand zersetzt von Natr. uric. = 0,125 g ū: 0,119 g ū.

Versuch Nr. 11. 27. III. 1905. R. N. P. IV; ohne Anwendung der Farbenmühle zwei Tage abwechselnd mit Alkohol und Toluol gewaschen, schließlich mit einer Mischung von Toluol und Alkohol *aa* extrahiert, schließlich mit Toluol gespült und getrocknet.

2,5 g zersetzen Natr. uric. = 0,125 g *ū* restlos.

Versuch 32. 23. V. 1905. R. N. P. VII; ohne Anwendung der Farbenmühle zuerst dreimal mit Toluol, dann viermal mit einer Mischung von Toluol und Alkohol extrahiert.

2,0 g mit 0,8 proz. Na Cl-Lösung 4 Stunden geschüttelt, zentrifugiert. Das Zentrifugat zersetzt von Natr. uric. = 0,125 g *ū*: 0,016 g *ū*. Der Rückstand zersetzt Natr. uric. = 0,125 g *ū* restlos.

Versuch Nr. 102. H. L. P. X. (Kontrolle.)

25. VI. 1906. 10 g mit 0,05 Proz. Soda, 0,8 Proz. Na Cl, 0,08 Proz. Thymol gemahlen ad 200; 20 ccm = 1 g.

20 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,105 g *ū*.

Versuch Nr. 107 (dasselbe Präparat).

1. VII. 1906. 5 g mit Aceton gemahlen, etwas Toluol zugesetzt, nachmittags abgesaugt, gewaschen und getrocknet.

2. VII. 1906. 4 g dieses extrahierten Pulvers mit 0,05 Proz. Soda, 0,08 Proz. Thymol gemahlen. Vol. 80; 20 ccm = 1 g.

20 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,125 g *ū*.

Versuch Nr. 114 (3) (Kontrolle). R. N. P. XIII. 12. VII. 1906.

5 g mit 0,05 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol gemahlen ad 250; 50 ccm = 1 g.

50 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,129 g *ū*: 0,107 g *ū*.

Versuch Nr. 111 (4). R. N. P. XIII. 10. VII. 1906.

20 g viermal in verschlossener Flasche durch je 24 Stunden mit Aceton extrahiert, 5 g davon mit 0,05 Proz. Soda und 0,8 Proz. Na Fl gemahlen ad 150; 30 ccm = 1 g.

30 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,13 g *ū*: 0,10 g *ū*.

Versuch Nr. 115 (1) und II. R. N. P. XIII. 12. VII. 1906.

Einmal durch 24 Stunden mit Aceton extrahiert.

1. 2 g dieses Pulvers mit 0,05 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol gemahlen ad 100; 50 ccm = 1 g.

50 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,129 g *ū*: 0,11 g *ū*.

II. Der Rest des Pulvers noch einmal 12 Stunden mit Aceton extrahiert. Toluol nachgewaschen.

2 g dieses Pulvers mit 0,05 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol gemahlen ad 100; 50 ccm = 1 g.

50 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,09 g *ū*.

Die Versuche zeigen, daß selbst lange Behandlung der trockenen Pulver mit Toluol und Äthylalkohol die Wirksamkeit des Fermentes nicht herabsetzt; im Gegenteil scheinen die mit Alkohol extrahierten Pulver gelegentlich besser zu wirken. Dasselbe Resultat ergaben die Versuche mit Aceton. Nur Versuch 115, II macht hiervon eine, namentlich im Vergleich mit Versuch

111, 4 unerklärliche Ausnahme, vielleicht spielt hierbei das zugesetzte Antiseptikum die entscheidende Rolle. — Diese Extraktionsmittel dürfen nur bei vollkommen trockenen Pulvern angewendet werden und müssen selbst möglichst wasserfrei sein, im entgegengesetzten Falle wird durch ihre Einwirkung nicht nur das Ferment geschädigt (vgl. unten Alkohol als Fällungsmittel), sondern auch die Löslichkeit der Organeiweißkörper herabgesetzt.

Der wasserlösliche Teil der Alkohol- oder Acetonextrakte zusammen mit Salzen und Farbstoffen kann durch Dialyse entfernt werden. Diese schädigt das Ferment nicht, es verbleibt ungeschwächt innerhalb des Schlauches, ja häufig zeigten die dialysierten Emulsionen eine bessere Wirksamkeit als das Ausgangsmaterial. Natürlich muß unter Berücksichtigung des oben Ausgeführten die Dialyse gegen 0,05 proz. sodahaltige Flüssigkeiten erfolgen. Hier die entsprechenden Versuche:

Versuch Nr. 69 (1, 2, 4). R. N. P. XI A. XII. 1905.

5 g mit 0,025 Proz. Thymol gemahlen ad 200; 40 ccm = 1 g.

1. 40 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,11g *ū*.

2. 80 ccm = 2 g zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,12 g *ū*.

4. 40 ccm, 48 Stunden gegen die gleiche Flüssigkeit dialysiert, zersetzen Natr. uric. = 0,14 g *ū* restlos.

Versuch Nr. 93, I (1). R. N. P. XII A. (Kontrolle.) 25. V. 1906.

8,3 g mit 0,05 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol gemahlen ad 320; 40 ccm = 1 g.

40 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,12 g *ū*.

Versuch Nr. 82 (1). R. N. P. XII A. 18. III. 1906.

20 g durch Dialyse und Fällung mit Kaliumacetat „plasma“ frei gewaschen, gegen 0,05 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol dialysiert. Vol. 550; 27 ccm = 1 g.

30 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,13 g *ū*.

Am 30. IV. 1906 zerlegen 30 ccm von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,13 g *ū*.

Versuch Nr. 91 (1, 2, 3). H. L. P. VII. 12. V. 1906.

5 g mit 0,05 Proz. Soda und Chloroform gemahlen. Vol. 200; 40 ccm = 1 g.

1. 13. V. 1906. 40 ccm (Toluol) zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,04 g *ū*.

Der Rest der Emulsion wird bis 17. V. gegen 0,05 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol dialysiert. Endvol. 325; 81 ccm = 1 g.

2. 17. V. 1906. 65 ccm zerlegen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,07 g *ū*.

3. 22. V. 1906. 81 ccm zerlegen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,12 g *ū*.

Versuch Nr. 92, I (1). II (1, 2, 3, 4). H. L. P. III.

14. V. 06. 10 g mit 0,05 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol gemahlen ad 300; 30 ccm = 1 g.

I (1). 15. V. 1906. 30 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,117 g *ū*.

270 ccm dialysiert gegen dieselbe Flüssigkeit 14. V. bis 20. V. 1906. Vol. 630 = 9 g; 70 ccm = 1 g.

II (1). 21. V. 1906. 70 ccm Emulsion zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū* 0,112 g *ū*.

2. 21. V. 1906. 70 ccm klares Filtrat der Emulsion zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,14 g *ū*.

3. 23. V. 1906. 70 ccm klares Filtrat der Emulsion zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,125 g *ū*.

4. 23. V. 1906. 140 ccm klares Filtrat der Emulsion zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū* restlos.

Versuch Nr. 102 (Kontrolle). H. L. P. X.

25. VI. 1906. 10 g mit 0,05 Proz. Soda, 0,08 Proz. Na Cl und 0,08 Proz. Thymol gemahlen ad 200; 20 ccm = 1 g.

26. VI. 1906. 20 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,105 g *ū*.

Versuch Nr. 105. Dasselbe Präparat.

27. VI. 1906. 20 g mit 0,05 Proz. Soda, 0,08 Proz. Thymol gemahlen, dialysiert bis 3. VII. 1906. Vol. 1000; 50 ccm = 1 g.

50 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,12 g *ū*.

Versuch Nr. 107. H. L. P. X (einmal mit Aceton extrahiert).

2. VII. 1906. 4 g mit 0,08 Proz. Thymol und 0,05 Proz. Soda gemahlen ad 80; 20 ccm = 1 g.

20 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,125 g *ū* (vgl. Versuch 102).

Der Rest 3 × 20 ccm gegen 0,08 Proz. Thymol und 0,05 Proz. Soda dialysiert bis 9. VII. 1906. Vol. 192; 64 ccm = 1 g.

9. VII. 1906. 64 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,123 g *ū*: 0,10 g *ū*.

Schließlich lassen sich noch durch Extraktion mit physiologischer Kochsalzlösung jene Eiweißkörper der Organe entfernen, welche Pohl[1]) als Organplasma beschrieben und studiert hat. Es wird weiter unten gezeigt werden, daß selbst aus den vollständig zertrümmerten Zellen das Ferment in das Filtrat gar nicht übergeht. Trotzdem nun diese Extraktion mit unseren Pulvern (namentlich solchen, die außerdem mit Aceton behandelt sind) sehr rasch und leicht vonstatten geht, so ist hierbei doch mit dem Umstand zu rechnen, daß das Ferment die native (neutrale?) Reaktion der Emulsion nicht verträgt. Andererseits ist, wie ebenfalls noch gezeigt werden wird, bei Verwendung von sodahaltigen Lösungen, namentlich bei Hundeleber, die Gefahr vorhanden, daß Ferment mit dem Filtrat verloren geht. — Diese Salz- oder Wasserextraktion, welche neben der Entfernung einer großen Menge unwirksamer Eiweißkörper (und eines mit Phosphorwolframsäure fallenden, nicht koagulablen und nicht dialysablen Körpers, sowie nicht dialysabler Farbstoffe) dasselbe leistet wie die Dialyse, gelingt aber, wie wir zeigen werden, auch bei alkalischer Reaktion auf dem Umwege einer Fällung durch Filtration, ohne daß dabei das Ferment verloren zu gehen braucht. Versuch 82 (1) und Versuch 93, I (1), S. 269, sind hierfür ein Beispiel.

---

[1]) Pohl, Über Organeiweiß. Diese Beiträge 7, 381 (1906).

Der günstige Einfluß aller der besprochenen Extraktionen des Organpulvers auf die Wirksamkeit des Fermentes findet vielleicht in folgenden Beobachtungen seine Erklärung, welche für das Vorhandensein saurer, dialysabler und alkohollöslicher Körper in den Organpulvern sprechen und es nahe legen, daß diese in größerer Menge das Ferment abzutöten vermögen. (Es ist leicht möglich, daß diese Körper jeweils in verschiedener Menge vorhanden, auch die verschiedene Empfindlichkeit der einzelnen Präparate gegen die native Reaktion bedingen und daß deren Anwesenheit es erklärt, warum, wie oben gezeigt, ein mit Alkohol extrahiertes Pulver mit neutraler Flüssigkeit digeriert, im Gegensatz zu nicht extrahierten Präparaten, noch nach acht Tagen voll wirksam gefunden wurde.)

1. Bei der Dialyse gegen 0,05 proz. Sodalösung reagiert im Beginne die abfließende Flüssigkeit deutlich weniger alkalisch als die zufließende, manchmal fast neutral.

2. Die mit 0,05 Proz. Soda hergestellten Emulsionen reagieren nach kurzem Stehen fast stets nicht mehr oder kaum alkalisch.

Während diese beiden Momente auch auf Alkalibindung durch die Eiweißkörper bezogen werden können, ist der Befund, daß der Alkoholextrakt in Wasser gelöst (gegen Lackmus) schwach sauer reagiert, eindeutig.

3. Der wasserlösliche Teil des Alkoholextraktes hemmt die Fermentation und zerstört wahrscheinlich das Ferment.

Versuch Nr. 28. R. N. P. V. 9. V. bis 17. V. 1905.

Mit Toluol und Alkohol ohne Anwendung der Farbenmühle extrahiert; desgleichen mit NaCl-Lösung gewaschen. 2,5 g mit der Hälfte des wasserlöslichen Teiles des Alkoholextraktes von R. N. P. IV (enthält keine Purinkörper) und Toluol bis 11. V. im Thermost. bei 40°.

12. V. 1906. Zentrifugiert; das Zentrifugat zersetzt von Natr. uric. = 0,125 g $\bar{u}$: 0,017 g $\bar{u}$; der Rückstand bis 17. V. 1905 im Eisschrank zersetzt augenscheinlich nichts; die Probe ging vor der Wägung verloren.

Als Kontrolle: Versuch Nr. 20. 17. III. 1905 mit demselben Präparat.

2,5 g 1 Stunde im Thermost. mit Kochsalzlösung zersetzen Natr. uric. = 0,125 g $\bar{u}$ restlos.

Versuch Nr. 82, 4 und 6. 30. IV. 1906.

Plasmafreie, dialysierte Emulsion von R. N. P. XII. A. 30 ccm = 1 g.

6. 30 ccm zersetzt von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$: 0,13 g $\bar{u}$.

4. 30 ccm, mit der Hälfte des Alkoholextraktes einer Rinderniere versetzt (Filtration war unmöglich), zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$, wenn überhaupt etwas, so sehr wenig; nach dem Zersetzen des Silberniederschlages war wegen der fettigen Stoffe kein Filtrat zu erzielen, die Bestimmung konnte nicht zu Ende geführt werden.

Diese beiden Versuche sind leider nicht ganz einwandfrei, wir führen sie aber, vorbehaltlich noch weiter anzustellender, doch an, da wir über keine anderen in dieser Richtung verfügen und der Sache doch einige Wichtigkeit zukommt.

Die Wirkung des Dialysates auf das Ferment haben wir nicht geprüft, dagegen gefunden, daß der homologe Kochsalzextrakt, das sog. „Plasma", eines mit Alkohol extrahierten Pulvers das Ferment unbeeinflußt läßt.

Versuch Nr. 24. 3. bis 5. V. 1905. R. N. P. V mit Toluol, Alkohol und Salzlösung extrahiert.

2,5 g werden mit dem gesamten Kochsalzextrakt des Ausgangsmaterials verrieben, nach 24 Stunden zentrifugiert. Das Zentrifugat zersetzt von Natr. uric. = 0,125 g *ū*: 0,01 g *ū*, der Rückstand zersetzt von Natr. uric. = 0,125 g *ū*: 0,122 g *ū*.

Kontrolle siehe S. 271, Versuch Nr. 20.

Andererseits fanden wir aber, daß natives Kaninchenleberplasma (aus dem frischen, nicht getrockneten Organ gewonnen) die Fermentation nicht nur hemmt (S. 259), sondern das Ferment geradezu zerstört.

Versuch Nr. 29. 10. bis 12. V. 1905.

Dasselbe Präparat und dieselbe Kontrolle wie beim vorigen Versuch. 1,5 g mit der Hälfte eines Kaninchenleberplasma 3 Stunden geschüttelt, dann bis zum nächsten Tag im Eisschrank. Hierauf zentrifugiert. Das Zentrifugat zersetzt von Natr. uric. = 0,125 g *ū*: 0,00 g *ū*, der Rückstand zersetzt von Natr. uric. = 0,125 g *ū*: 0,03 g *ū*.

4. Einfluß der antiseptischen Zusätze. Während bei Eisschrank- sowie Zimmertemperatur alle versuchten Antiseptika (0,08 Proz. Thymol, 0,4 Proz. NaFl, Toluol oder Chloroform im Überschuß) keinen merklichen Einfluß auf die Wirksamkeit des Fermentes hatten (die Emulsionen wurden oft nach vielen Wochen ebenso wirksam befunden wie unmittelbar nach ihrer Herstellung), zeigten die mit 0,08 Proz. Thymol versetzten Emulsionen in der Wärme bei 37 bis 40° eine Abnahme ihrer Wirkungsintensität. Wiewohl wir keine vergleichenden Untersuchungen der genannten Antiseptika in dieser Richtung angestellt haben, so scheinen uns doch die übrigen Zusätze (namentlich Fluorid, Toluol) auch bei Bluttemperatur ohne Wirkung zu sein, da in zahlreichen Versuchen, wo zwecks besserer Extraktion die Wärme angewendet wurde, eine Abnahme der Wirkung unter diesen Zusätzen nicht beobachtet werden konnte (vgl. z. B. Versuch Nr. 48, S. 262). Als Beispiel für die Thymolwirkungen mögen folgende Versuche dienen:

Versuch Nr. 73 (7). R. N. P. XI. A.

10 g mit 0,08 Proz. Thymol und 0,025 Proz. Soda gemahlen. Dialyse durch drei Tage. Vol. 300; 30 = 1 g.

2. bis 3. I. 1906. 30 ccm bei Zimmertemperatur gestanden, zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,14 g *ū*. 30 ccm, 24 Stunden bei 37° gestanden, zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,11 g *ū*.

Versuch 82 (1, 3, 6). R. N. P. XII. A.

20 g durch Acetat und Dialyse plasmafrei (0,08 Proz. Thymol, 0,05 Proz. Soda). Vol. 550; 27 = 1 g.

18. III. 1906. 30 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,13 g *ū*.

30. IV. 1906. 30 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,13 g *ū*.

30. IV. 1906. 30 ccm 14 Tage bei 37°, später in der Kälte gestanden, zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,11 g *ū*.

Versuch Nr. 114. R. N. P. XIII.

5 g mit 0,05 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol gemahlen ad 250; 50 = 1 g.

12. bis 15. VII. 1906. 50 ccm, bei Zimmertemperatur gestanden, zersetzen von Natr. uric. = 0,138 g *ū*: 0,12 g *ū*.

12. bis 15. VII. 1906. 50 ccm, bei 37° gestanden, zersetzen von Natr. uric. = 0,138 g *ū*: 0,103 g *ū*.

5. Der Einfluß proteolytischer Fermente und des Harnstoffs auf das harnsäurezerstörende Ferment soll unter einem besprochen werden, da beide wegen ihrer lösenden Eigenschaften Eiweißkörpern gegenüber in den Bereich unserer Versuche gezogen worden sind, bzw. daran gedacht werden konnte, das Ferment durch Abverdauen der Organe darzustellen. Über die lösenden Eigenschaften der konzentrierten Harnstofflösung berichtete zuerst Spiro[1]), dann Ramsden[2]), welcher gleichzeitig einen schädigenden Einfluß auf Trypsin und die Keimungsfähigkeit von Senf- und Kressensamen feststellte.

Die nachfolgenden Versuche zeigen, daß die Harnsäureoxydase durch Papaïn und Trypsin schon in 24 Stunden deutlich geschädigt bzw. zerstört wird. Das Pepsin kam wegen der schädigenden Wirkung freier Säure überhaupt nicht in Betracht. Ebensowenig das autolytische Enzym, da der notwendige Sodazusatz seine Wirkung hemmt (vgl. Wiener[3]) und die dort angeführte Literatur).

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **30**, 182—199; 1900.

[2]) Some new properties of urea. Journ. of phys. **28**; zitiert nach Jahrb. f. Tierchem. **32**, 148.

[3]) Über den Einfluß der Reaktion auf autolytische Vorgänge: Zentralbl. f. Physiol. 1905, **19**, Nr. 11.

Da sich übrigens gezeigt hat, daß auch mit Alkohol extrahierte Pulver, die in neutralen Emulsionen ihre Wirkung lange beibehielten, schließlich nach mehreren Tagen doch bei Bluttemperatur in ihrer Wirksamkeit abnahmen, für diese Abnahme jene oben besprochenen, schädigenden (möglicherweise saueren) Organbestandteile jedoch nicht in Betracht kommen, könnte man für diese Abnahme vielleicht eine schädigende Wirkung des autolytischen Fermentes verantwortlich machen, wenn auch für diesen Versuch der konservierende Einfluß der alkalischen Reaktion festgestellt wäre.

Versuch Nr. 23. R. N. P. V.

Mit Toluol, Alkohol und Kochsalzlösung extrahiert.

3. V. 1905. 2,5 g mit 10 ccm Papain- und Kochsalzlösung bei 40° zusammengebracht.

4. V. 1905. Da eine Vergleichsprobe mit koaguliertem Eierklar sich nicht wesentlich verändert hatte, wurde zu beiden Proben noch je 0,25 g Papain in 10 ccm NaCl-Lösung zugesetzt.

5. V. 1905. Die Verdauung unterbrochen, die Nierenemulsion filtriert. Das Filtrat zersetzt von Natr. uric. = 0,125 g *ū*: 0,01 g *ū*. Der Rückstand zersetzt von Natr. uric. = 0,125 g *ū*: 0,03 g *ū*.

Als Kontrolle der Wirksamkeit des Ausgangsmaterials kann der vielfach zitierte Versuch Nr. 20 (S. 253) dienen und als Kontrolle der Wirkungslosigkeit zweitägigen Aufenthaltes dieser extrahierten Pulver bei 37 bis 40° Versuch Nr. 17 (S. 262).

Versuch Nr. 70 (4, 5, 7). R. N. P. XI.

15. XII. 1905. 10 g mit 0,08 Proz. Thymol und 0,025 Proz. Soda gemahlen ad 200; 20 = 1 g.

7. 17. XII. 1905 (Kontrolle). 20 + 50 ccm Rinderserum zersetzen Natr. uric. = 0,14 g *ū* restlos.

4. 15. XII. 1905. 20 ccm + 0,05 Trypsin bis 16. XII. 1905 im Thermost. bei 40°. Zentrifugiert. Rückstand zersetzt von Natr. uric. = 0,14 g *ū* : 0,08 g *ū*.

5. 15. XII. 1905. 20 ccm + 0,05 Trypsin bis 16. XII. 1905 im Thermost. bei 40°, dann bis 17. XII. 1905 Zimmertemperatur.

17. bis 18. XII. 1905 wieder Thermost. bei 40°, dann bis 19. XII. 1905 Dialyse gegen dieselbe Flüssigkeit. Zentrifugiert. Zentrifugat zersetzt von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,06 g *ū*, Rückstand zersetzt von Natr. uric. 0,14 g *ū*: 0,02 g *ū*.

Versuch Nr. 73 (1). R. N. P. XI.

10 g mit 0,025 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol gemahlen, dann Dialyse gegen dieselbe Flüssigkeit 17. bis 20. XII. 1905. Vol. 300; 30 = 1 g.

20. XII. 1905. 30 ccm + 0,3 ccm 5 proz. Soda und 0,01 Trypsin bis 21. XII. 1906 bei 40° gestanden.

21. XII. 1905 filtriert und gewaschen.

22. XII. 1905. Filtrat zersetzt von Natr. uric. = 0,14 g u: 0,02 g $\bar{u}$. Rückstand zersetzt von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$: 0,09 g $\bar{u}$.

20. bis 21. XII. 1905. 30 ccm + 0,05 Trypsin bei 40°, zersetzt von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$: 0,07 g $\bar{u}$.

Als Kontrolle Versuch Nr. 73, 7.

2. bis 3. I. 1906. 30 ccm bei 40° gestanden, zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$: 0,11 g $\bar{u}$.

Versuch Nr. 75 (1, 2). Dasselbe Präparat.

4 g mit 0,05 Proz. Soda und Toluol gemahlen, ad 100; 25 = 1 g.

1. 2. I. 1906. 25 ccm + 0,1 Trypsin + 80 ccm 0,05 Proz. Soda bis 3. I. 1906 bei 40° gestanden.

3. I. 1906 zersetzt von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$: 0,09 g $\bar{u}$.

2. 25 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$: 0,13 g $\bar{u}$. (Kontrolle.)

Ein Kontrollversuch zeigte, daß Trypsin an sich Harnsäure nicht zu spalten vermag. Den Einwand, daß durch die Proteolyse Purinkörper in Freiheit gesetzt und im Verlaufe des Versuchs zu Harnsäure oxydiert werden könnten, deren Gegenwart dann, trotz voll erhaltener Wirksamkeit des Fermentes, eine Schädigung vortäuschen würde, haben wir experimentell nicht geprüft. Bei der kurzen Dauer der Versuche und den geringen Organquantitäten erscheint ein solches Verhalten nicht nur sehr unwahrscheinlich, sondern es spricht auch Versuch Nr. 73 (1), S. 274 dagegen, in welchem der Filtrationsrückstand (der doch als frei von gelösten Purinen angenommen werden kann) eine deutliche Schädigung des Fermentes zeigt. Immerhin wird es notwendig sein, einige Kontrollversuche zu machen.

Versuche mit Harnstoff.

Versuch Nr. 16. R. N. P. IV. Mit Toluol und Alkohol ohne Anwendung der Farbenmühle extrahiert.

30. III. 1905. 5 g mit Kochsalzlösung erschöpft, hierauf mit konzentrierter Harnstofflösung 3 Stunden geschüttelt. Zentrifuge. — Rückstand mit H_2O gewaschen. Zentrifugat in dünner Schicht bei 37° getrocknet, mit Alkohol von Harnstoff befreit, getrocknet. Rückstand zersetzt von Natr. uric. = 0,125 g $\bar{u}$: 0,02 g $\bar{u}$. Das Zentrifugat zersetzt von Natr. uric. = 0,125 g $\bar{u}$: 0,02 g $\bar{u}$.

Die Wirksamkeit des Pulvers beweist z. B. Versuch 17, S. 262.

Versuch Nr. 22. R. N. P. V. Extrahiert mit Alkohol, Toluol und Salzlösung.

20. VI. 1906. 2,5 g mit Glaspulver und konzentrierter Harnstofflösung und Toluol 1 Stunde verrieben, 24 Stunden im Eisschrank, zentrifugiert. Rückstand auf dem Filter mit H_2O gewaschen. Zentrifugat gegen H_2O dialysiert vom

24. IV. bis 1. V. 1906. Rückstand zersetzt von Natr. uric. = 0,125 g ū: 0,03 g ū. Zentrifugat zersetzt von Natr. uric. = 0,125 g ū: 0,00 g ū.

Als Kontrolle für die Unschädlichkeit der Dialyse gegen Wasser in diesem Falle dient ein paralleler, gleichmäßig ausgeführter Versuch, in dem statt konzentrierter Harnstofflösung Glyzerin verwendet wurde.

Rückstand und Zentrifugat wurden gegen H_2O dialysiert, bzw. mit H_2O gewaschen. Der Rückstand zersetzt Natr. uric. = 0,125 g ū restlos. Das Zentrifugat zersetzt von Natr. uric. = 0,125 g ū: 0,02 g ū.

Versuch Nr. 27. 8. V. 1905. R. N. P. V.

Mit Alkohol, Toluol und Salzlösung extrahiert. (Dasselbe Präparat wie Versuch Nr. 22.)

2,5 g mit 100 g 5 proz. Harnstofflösung gemahlen, bis 9. V. 1905 Eisschrank, 3 Stunden bei Zimmertemperatur geschüttelt, 10. V. 1905 zentrifugiert. Rückstand auf dem Filter mit Wasser gewaschen. Zentrifugat gegen Wasser dialysiert. 12. V. 1905. Rückstand zersetzt von Natr. uric. = 0,125 g ū: 0,02 g ū, das Zentrifugat zersetzt von Natr. uric. = 0,125 g ū: 0,01 g ū.

Kontrolle wie im vorigen Versuch.

Versuch Nr. 70 (8). 14. bis 17. XII. 1905. R. N. P. XI. A.

10 g am 13. XII. 1905 mit 0,025 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol gemahlen ad 200; 20 ccm = 1 g, in 20 ccm werden 20 g Harnstoff gelöst; unter Umschütteln vom 14. bis 15. XII. 1905 bei Zimmertemperatur. Dann vom 15. bis 17. XII. 1905 dialysiert gegen 0,025 proz. Sodalösung mit 0,08 Proz. Thymol. 17. XII. 1905 zentrifugiert. Zentrifugat zersetzt von Natr. uric. = 0,14 g ū: 0,00 g ū. Rückstand zersetzt von Natr. uric. = 0,14 g ū: 0,08 g ū.

Als Kontrolle: 17. XII. 1905.

20 ccm + 50 Rinderserum zersetzen Natr. uric. = 0,14 g ū restlos.

Aus diesen Versuchen ergibt sich eine deutlich schädigende Wirkung selbst von 5 proz. Harnstofflösungen auf das Ferment.

6. Der Einfluß von Eiweißfällungsmitteln auf die Wirksamkeit des Fermentes. Die durch Vermahlen der Organpulver mit 0,05 Proz. Sodalösung erhaltenen, eventuell durch Dialyse gereinigten Emulsionen geben mit verschiedenen eiweißfällenden Substanzen flockige Fällungen, die sich zum Teil zu einer Fraktionierung der Emulsionen eignen. Von solchen Reagenzien haben wir die Wirkung konzentrierter Ammonsulfatlösung, einer Lösung von Kaliumacetat in Wasser zu gleichen Teilen, einer 10 proz. Calciumchloridlösung und des Äthylalkohols auf die Wirksamkeit des Fermentes geprüft.

a) Konzentrierte Ammonsulfatlösung:

Versuch Nr. 64. R. N. P. VIII.

29. X. 1905. 3 g mit 0,05 Proz. Soda und 0,4 Proz. NaFl gemahlen, bis 31. X. 1905 Eisschrank.

31. X. 1905 auf 200 ccm gebracht, durchgeschüttelt und zentrifugiert. Das Zentrifugat (I. Extrakt) mit $^1/_3$ Vol. gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt, rasch zentrifugiert. Rückstand und Zentrifugat bis 3. XI. 1905 gegen 0,05 Proz. Soda und 0,4 Proz. NaFl dialysiert. Dabei löst sich die Fällung völlig zu einer opaleszenten Flüssigkeit. Fällung zersetzt Natr. uric. = 0,125 g $\bar{u}$ restlos.

Der Emulsionsrückstand nach der I. Extraktion wurde noch einmal mit derselben Flüssigkeit 24 Stunden im Eisschrank digeriert und hierauf durch Zentrifugieren ein II. Extrakt gewonnen. 3. XI. 1905.

II. Extrakt mit nicht ganz $^1/_3$ Vol. gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt, sofort zentrifugiert. Fällung und Zentrifugat, ebenso behandelt wie beim I. Extrakt, verhält sich ebenso. Die Fällung zersetzt Natr. uric. = 0,125 g $\bar{u}$ restlos.

Die vereinigten Zentrifugate von Extrakt I und II zersetzen von Natr. uric. = 0,125 g $\bar{u}$: 0,08 g $\bar{u}$.

Der Emulsionsrückstand nach der II. Extraktion zersetzt von Natr. uric. = 0,125 g $\bar{u}$: 0,11 g $\bar{u}$.

Versuch Nr. 68. R. N. P. X.

10 g mit 0,05 Proz. Soda und 0,4 Proz. NaFl mit $^1/_5$ Vol. Ammonsulfatlösung gefällt und zentrifugiert. Die Prozedur dauert vom 25. bis 30. XI. 1905. Die Fällung dialysiert. Nach der Dialyse im Filtrat von der aufgelösten mit HCl ausgeflockten Fällung mit Phosphorwolframsäure keine Reaktion. $^1/_{10}$ dieser Emulsion zersetzt von Natr. uric. = 0,125 g $\bar{u}$: 0,11 g $\bar{u}$. $^{1,5}/_{10}$ dieser Emulsion zersetzt Natr. uric. = 0,125 g $\bar{u}$ restlos.

Versuch Nr. 73 (6 und 5). R. N. P. XI. A.

17. XII. 1905. 10 g mit 0,025 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol gemahlen und bis 20. XII. 1905 dialysiert. Vol. 300; 30 = 1 g.

6. 21. XII. 1905. 30 ccm + 10 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, 40 ccm $^1/_4$ gesättigter Ammonsulfatlösung und 0,5 ccm 5 proz. Sodalösung; nach Eintreten der Ausflockung filtriert und mit alkalischer (0,05 Proz. Soda) $^1/_4$ gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen. Niederschlag abgepreßt, in 0,05 Proz. Soda verteilt, in derselben Weise durch $^1/_6$ Sättigung mit Ammonsulfat gefällt. Filtrat eiweißfrei. Rückstand abgepreßt, in 0,05 proz. Sodalösung verteilt, mit Toluol vom 22. XII. 1905 bis 6. I. 1906 in der Kälte gehalten, dann bis 8. I. 1906 gegen 0,05 proz. Sodalösung und Toluol dialysiert. Hierauf zentrifugiert (Extrakt I), Rückstand mit 0,05 proz. Sodalösung und Toluol 34 Stunden bei 37° aufgestellt und dann zentrifugiert (Extrakt II). In derselben Weise noch ein III. Extrakt hergestellt.

10. I. 1906. Extrakt III zersetzt von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$: 0,02 g $\bar{u}$, der Rückstand zersetzt von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$: 0,02 g $\bar{u}$, die vereinigten Extrakte I, II zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$: 0,09 g $\bar{u}$.

5. Als Kontrolle.

21. XII. 1905. 30 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$: 0,11 g $\bar{u}$.

Versuch Nr. 75 (2, 4). R. N. P. XI. A.

2. I. 1906. 4 g mit 0,05 Proz. Soda gemahlen ad 100; Toluol; 25 = 1 g.

2. Als Kontrolle.

25 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$: 0,13 g $\bar{u}$.

4. 9. I. 1906. 25 ccm mit $^1/_4$ Vol. gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt und mit derselben Konzentration eiweißfrei gewaschen. Rückstand gegen 0,05 Proz. Soda (Toluol, Chloroform) dialysiert 10. bis 12. I. 1905, zersetzt von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$: 0,05 g $\bar{u}$.

Versuch Nr. 76 (2, 3, 5, 6.) R. N. P. XI. B. Mit Toluol gemahlen, aber nicht extrahiert.

13. I. 1906. 10 g mit 0,05 Proz. Soda und Chloroform gemahlen ad 200; 20 = 1 g.

2. 14. I. 1906. 20 ccm + 5 ccm gesättigte Ammonsulfatlösung, 24 Stunden bis 15. I. in der Kälte gestanden (Chloroform), ohne Filtration, 15. bis 17. I., dialysiert gegen 0,05 proz. Sodalösung (Chloroform), zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$: 0,09 g $\bar{u}$.

3. Kontrolle.

15. bis 17. I. 1906. 20 ccm gegen dieselbe Flüssigkeit dialysiert, zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$: 0,13 g $\bar{u}$.

19. bis 22. I. 1906. 120 ccm gegen 0,05 Proz. Soda, Chloroform dialysiert. Vol. 300; 50 = 1 g.

6. Kontrolle.

23. I. 1906. 50 ccm zentrifugiert, hierauf der Rückstand 4 Stunden bei 40° mit 0,05 Proz. Soda und 0,4 Proz. NaFl geschüttelt, zentrifugiert und der Rückstand noch ein zweites Mal so behandelt.

27. I. 1906. Die vereinigten Extrakte zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$: 0,12 g $\bar{u}$.

5. 22. I. 1906. 50 ccm zentrifugiert, der Rückstand mit 0,05 Proz. Soda, Toluol 4 Stunden bei 40° geschüttelt und zentrifugiert. Die vereinigten Extrakte werden mit $^1/_5$ Vol. gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt, sofort zentrifugiert und Fällung und Zentrifugat gegen 0,05 proz. Sodalösung (Chloroform) dialysiert bis 26. I. 1906. Fällung (zur Opaleszenz gelöst) zersetzt von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$: 0,03 g $\bar{u}$, Zentrifugat zersetzt von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$: 0,03 g $\bar{u}$.

In den ersten beiden Versuchen dieser Reihe zeigt sich durch Ammonsulfat keine schädigende Wirkung auf das Ferment. In allen übrigen Versuchen schädigt aber die selbst nur kurz dauernde Gegenwart von geringen Mengen Ammonsulfat in verschiedenem Maße, bis zur völligen Zerstörung des Fermentes. Worauf dieses abweichende Verhalten zurückzuführen ist, haben wir nicht ermitteln können; das Antiseptikum scheint, wie die Versuche gezeigt haben, keinen Einfluß zu haben. Die verwendete Ammonsulfatlösung war stets durch 0,05 Proz. Sodazusatz alkalisch gehalten.

b) Calciumchlorid (10 Proz.)

Versuch Nr. 58. R. N. P. IX.

13. X. 1905. 3 g mit 0,05 Proz. Soda und 0,4 Proz. NaFl gemahlen, nach 6 Stunden im Eisschrank zentrifugiert: Extrakt I. Rückstand mit derselben

Flüssigkeit nach 24 Stunden im Eisschrank zentrifugiert: Extrakt II; in derselben Weise noch ein Extrakt III hergestellt. Der letzte Rückstand zersetzt Natr. uric. = 0,13 g *ū* restlos, die vereinigten Extrakte II und III zersetzen Natr. uric. = 0,13 g *ū* restlos.

Extrakt I mit einigen Tropfen $CaCl_2$ gefällt, die Fällung zentrifugiert. Das Zentrifugat zersetzt von Natr. uric. = 0,13 g *ū*: 0,05 g *ū*, die Fällung zersetzt von Natr. uric. = 0,13 g *ū*: 0,09 g *ū*.

Versuch Nr. 59. R. N. P. IX.

12. X. 1905. 3 g mit 0,05 Proz. Soda und 0,4 Proz. NaFl etwa 100 ccm vier Tage im Eisschrank.

16. X. 1905. Zentrifugiert: Extrakt I. Rückstand mit derselben Flüssigkeit 24 Stunden im Eisschrank.

17. X. 1905. Zentrifugiert: Extrakt II. Weiter in derselben Weise Extrakt III, IV und V hergestellt.

20. X. 1905. Extrakt IV und V vereinigt, zersetzen von Natr. uric. = 0,13 g *ū*: 0,03 g *ū*, der Rückstand zersetzt von Natr. uric. = 0,13 g *ū*: 0,08 g *ū*.

18. X. 1905. Die vereinigten Extrakte I bis III mit 9 ccm $CaCl_2$ gefällt und zentrifugiert.

19. X. 1905. $CaCl_2$-Fällung zersetzt Natr. uric. = 0,13 g *ū* restlos, das Zentrifugat zersetzt von Natr. uric. = 0,13 g *ū*: 0,09 g *ū*.

Versuch Nr. 61. R. N. P. XI.

16. X. 1905. 9 g mit 0,05 Proz. Soda und 0,4 Proz. NaFl gemahlen und in derselben Weise wie im vorigen Versuch vier Extrakte hergestellt. Extrakt III zersetzt von Natr. uric. = 0,13 g *ū*: 0,07 g *ū*, Extrakt IV zersetzt von Natr. uric. = 0,13 g *ū*: 0,06 g, der Rückstand zersetzt 0,13 g *ū* restlos. Extrakt I und II mit 15 ccm $CaCl_2$ (auf 350 ccm) gefällt, $1/3$ der in 0,05 Proz. Soda aufgeschwemmten Fällung zersetzt Natr. uric. = 0,13 g *ū* restlos.

Versuch Nr. 78 (3, 6). H. L. P. II.

Mit Toluol gemahlen, aber nicht extrahiert, mit 0,05 Proz. Soda und 0,4 Proz. NaFl gemahlen und gegen dieselbe Flüssigkeit, später gegen 0,05 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol dialysiert. 50 ccm = etwa 2 g.

3. 9. II. 1906. 50 ccm Zentrifugat zersetzen Natr. uric. = 0,14 g *ū* restlos.

6. 14. II. 1906. 50 ccm Zentrifugat werden mit 12 Tropfen $CaCl_2$-Lösung gefällt, die Fällung abzentrifugiert, der Rückstand, noch einmal ebenso behandelt, ging fast vollständig in Lösung. Die vereinigten Zentrifugate zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,12 g *ū*.

Diese Versuche zeigen, daß die Fällung der Emulsionen mit $CaCl_2$, wenn überhaupt, so nur in ganz unbedeutendem Maße, das Harnsäure zerstörende Ferment schädigt, und ferner daß die Fermentation selbst durch die Anwesenheit von geringen Ca-Mengen nicht beeinträchtigt wird.

c) Kaliumacetatlösung in Wasser *āā*. Wir führen hier bloß einen Versuch an und verweisen bezüglich weiterer Beweise für die Unschädlichkeit der Kaliumacetatlösung auf den nächsten Abschnitt, in welchem gezeigt wird, daß beim Ausfällen der Emulsionen das Ferment ungeschwächt niedergeschlagen werden kann.

Versuch Nr. 78 (7). H. L. I. Emulsion II. Gemahlen und dialysiert.

50 ccm = 2 g. 0,05 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol. 50 ccm Zentrifugat zersetzen Natr. uric. = 0,14 g *ū* restlos.

1. III. 1906. 50 ccm Zentrifugat + 5 ccm Kaliumacetatlösung + 25 H_2O, 24 Stunden bei Zimmertemperatur, 2. bis 5. III. 1906 dialysiert gegen 0,05 proz. Sodalösung mit 0,4 Proz. NaFl, zersetzen Natr. uric. = 0,14 g *ū* restlos.

d) Äthylalkohol. Größere Mengen Alkohol fällen wie andere Eiweißlösungen auch die Emulsionen unserer Organpulver in der Regel aus. Wie der folgende Versuch zeigt, geht jedoch das Ferment hierbei zugrunde, zumal wenn die Einwirkung des Alkohols längere Zeit dauert.

Versuch Nr. 70 (9, 7). R. N. P. XI. A.

10 g mit 0,085 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol gemahlen ad 200; 20 = 1 g.

7. Kontrolle.

17. XII. 1905. 20 ccm + 50 Rinderserum zersetzen Natr. uric. = 0,14 g *ū* restlos.

9. 17. bis 18. XII. 1905. 20 ccm mit dem mehrfachen Volumen Alkohol versetzt und 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Hierauf filtriert, der Alkohol mit Äther verdrängt. Der Rückstand bei Zimmertemperatur getrocknet, zersetzt am 19. XII. von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,01 g *ū*.

Zusammenfassung.

Die namentlich auch für Darstellungsversuche des Fermentes wichtigen Resultate dieses Abschnittes sind folgende:

1. In den trockenen Organpulvern ist das Ferment dauernd haltbar.

2. Bei Gegenwart von Wasser ist das Ferment der Emulsionen nur mit schwachem Alkali (0,05 Proz. Soda) dauernd haltbar. Höhere Konzentrationen an Karbonat können schaden, Laugen und Säuren zerstören das Ferment auch bei niederen Konzentrationsgraden sehr schnell.

3. Das Ferment ist nicht kochbeständig und beginnt schon bei 50° (während 24 Stunden) an Wirksamkeit einzubüßen.

4. Anwesenheit von 0,08 Proz. Thymol kann das Ferment in der Wärme etwas schädigen, bei Eisschrank- und Zimmertemperatur schädigt Thymol dagegen nicht.

5. Mit Toluol oder Fluorid verträgt das Ferment auch längeres Verweilen bei 37 bis 40°.

6. Die Organe enthalten alkohol- und wasserlösliche, wahrscheinlich saure Extraktstoffe, die das Ferment schädigen und zerstören können.

7. Die proteolytischen Fermente, Harnstoff schon zu 5 Proz., Äthylalkohol in fällenden Mengen und Ammonsulfat schädigen das Ferment rasch.

8. Calciumchlorid und Kaliumacetat haben keine schädigenden Wirkungen auf das Ferment.

5. Zur Darstellung des Fermentes.

1. Schwemmt man fein verteilte tierische Organe mit (Wasser oder) Salzlösungen auf, so kann man durch Filtration klare, eiweißhaltige Flüssigkeiten von charakteristischen Eigenschaften erhalten, welche Pohl[1]) als Organplasmen bezeichnet und studiert hat. In dieser Organfraktion, welche sich unter gewissen Bedingungen quantitativ gewinnen läßt, befindet sich das Harnsäure spaltende Ferment nicht. Wiener (l. c.) und Almagia (l. c.) fanden das Ferment ebenfalls nicht in den Preßsäften der Organe.

Versuch Nr. 31.

Ein Viertel von zwei ausgespülten und fein zerteilten Rindernieren (etwa 300 g) wird mit etwa dem doppelten Gewicht physiologischer Kochsalzlösung versetzt. 17. bis 18. V. 1905 im Eisschrank, hierauf Filtration. Nach mehrmaligem Wiederaufgießen des trüben Filtrates werden 200 ccm klares Filtrat gewonnen. Diese zersetzen von Natr. uric. = 0,13 g *ū*: 0,00 g *ū*.

Als Kontrolle Versuch Nr. 32.

2 g trockenes Pulver derselben Nieren zersetzen am 24. V. 1905 Natr. uric. = 0,13 g *ū* restlos.

Das Organplasma enthält das Ferment auch dann nicht, wenn man die Extraktion mit 0,05 proz. Sodalösung durch viele Wochen im Eisschrank vornimmt.

---

[1]) l. c.

Versuch Nr. 52.

Vier Rindernieren werden blutfrei gespült und in 0,05 Proz. Sodalösung sehr fein verteilt, Vol. 2000, vom 20. VII. bis 2. X. 1905 im Eisschrank.

22. VII. 1905. 100 ccm zersetzen Natr. uric. = 0,13 g *ū*: restlos.

17. X. 1905. 100 ccm zersetzen Natr. uric. = 0,13 g *ū*: restlos.

2. X. 1905. 200 ccm Filtrat zersetzen von Natr. uric. = 0,13 g *ū*: 0,00 g *ū*.

Dasselbe Verhalten zeigen Plasmen, die aus trockenen, nicht gemahlenen Pulvern dargestellt sind.

Versuch Nr. 8. R. N. P. III, ohne Anwendung der Farbenmühle mit Toluol und Alkohol extrahiert.

2,5 g mit 0,8 proz. Kochsalzlösung (auf der Zentrifuge) gewaschen (Zentrifugat klar). Die Lösung zersetzt von Natr. uric. = 0,13 g *ū*: 0,02 g *ū*. Der Rückstand zersetzt von Natr. uric. = 0,13 g *ū*: 0,12 g *ū*.

Versuch Nr. 14. Dasselbe Präparat wie im vorigen Versuche, jedoch noch mit Kochsalzlösung extrahiert.

28. III. 1905. 2,5 g mit 0,05 proz. Sodalösung 1 Stunde geschüttelt und dann dreimal gewaschen. Die klare Lösung zersetzt von Natr. uric. = 0,13 g *ū*: 0,02 g *ū*. Der Rückstand zersetzt von Natr. uric. = 0,13 g *ū*: 0,11 g *ū*.

Auch aus den in der Farbenmühle zermahlenen Pulvern (den vollständig zertrümmerten Zellen) geht das Ferment nicht in das Filtrat der Kochsalzlösung (auch nicht in 2 proz. Benzoatlösung) über. Wir beschränken uns auf die Wiedergabe eines Beispieles der Kochsalzversuche mit Hundeleber.

Versuch Nr. 98. H. L. P. III.

1. VI. 1906. 7,8 g mit 0,8 proz. NaCl-Lösung gemahlen und mit dieser auf dem Filter vollständig ausgewaschen. Die Gesamtfiltrate werden mit dem gleichen Gewicht Kaliumacetat versetzt; der abfiltrierte und durch Dialyse gegen 0,05 proz. Sodalösung gelöste Niederschlag = 140 ccm; 20 ccm = 1 g zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,00 g *ū*. Die Filtrate der Fällung = 1000; 140 ccm gegen 0,05 proz. Sodalösung mit 0,08 Proz. Thymol dialysiert, zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,00 g *ū*. Der Organrückstand mit Soda ad 350 dialysiert. 50 ccm zersetzt von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,08 g *ū*.

Werden dagegen die gemahlenen Pulver mit 0,05 proz. Sodalösung behandelt, so geht das Ferment in Lösung, allerdings nicht gleich. Die unmittelbar nach dem Vermahlen mit Sodalösung erhaltenen Filtrate sind so gut wie unwirksam, insbesondere bei Rinderniere. Unterwirft man dagegen diese Emulsionen einer fünf- bis sechstägigen Dialyse gegen 0,05 proz. Sodalösung, so geht das Ferment aus Hundeleber vollständig, aus Rinderniere zum Teil in das Filtrat über; gewiß ist auch hierfür die Gegenwart von Thymol ein Hemmnis, wie es gleich für die

Extraktion auf der Zentrifuge ersichtlich werden wird; die Löslichkeit des Fermentes aus Hundeleber in Karbonat scheint dagegen durch 0,08 Proz. Thymol nicht beeinflußt zu werden.

Versuch Nr. 92. H. L. P. III.

14. V. 1906. 10 g mit 0,05 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol gemahlen. Vol. 300; 30 = 1 g.

15. V. 1906. 30 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,12 g *ū*.

14. bis 20. V. 1906. 270 ccm gegen dieselbe Flüssigkeit dialysiert. Vol. 630; 70 = 1 g.

21. V. 1906. 70 ccm Emulsion zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,11 g *ū*.

21. V. 1906. 70 ccm klares Filtrat zersetzen Natr. uric. = 0,14 g *ū* restlos.

22. V. 1906. 70 ccm klares Filtrat zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,13 g *ū*.

23. V. 1906. 140 ccm klares Filtrat zersetzen Natr. uric. = 0,14 g *ū* restlos.

Versuch Nr. 93. R. N. P. XII.

26. V. 1906. 8,3 g mit 0,05 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol gemahlen ad 320; 40 = 1 g.

26. V. 1906. 40 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,12 g *ū*. Ein Teil der Emulsion wird nach 24 stündigem Stehen filtriert.

27. V. 1906. 40 ccm klares Filtrat zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,00 g *ū*.

26. bis 31. V. 1906. 4 × 40 ccm Emulsion dialysiert. Vol. 280; 70 = 1 g, ein Teil filtriert.

1. VI. 1906. 65 ccm klares Filtrat zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,07 g *ū*.

Versuch Nr. 94. H. L. P. VI.

25. V. 1906. 5 g mit 0,05 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol gemahlen ad 200; 40 = 1 g.

26. V. 1906. 40 ccm Emulsion zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,08 g *ū*.

27. V. 1906. 40 ccm klares Filtrat zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,04 g *ū*.

26. bis 31. V. 1906. 2 × 40 ccm Emulsion dialysiert. Vol. 200; 100 = 1 g.

1. VI. 1906. 130 ccm klares Filtrat zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,09 g *ū*.

Versuch Nr. 95. H. L. P. III.

7,8 g mit physiologischer Salzlösung vom Plasma befreit, hierauf gegen 0,05 proz. Sodalösung mit 0,08 Proz. Thymol drei Tage dialysiert. Vol. 350; 50 = 1 g.

13. VI. 1906. 50 ccm Emulsion zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū* 0,08 g *ū*.

15. VI. 1906. 100 ccm klares Filtrat zersetzen Natr. uric. = 0,14 g *ū* restlos.

Versuch Nr. 102. H. L. P. X.

25. VI. 1906. 10 g mit 0,05 Proz. Soda, 0,08 Proz. Thymol und 0,8 Proz. NaCl-Lösung gemahlen. Vol. 200; 20 = 1 g.

26. VI. 1906. 20 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,11 g *ū*.

26. VI. 1906. 50 ccm klares Filtrat zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,04 g *ū*.

Versuch Nr. 107. H. L. P. X, mit Aceton einmal extrahiert.

2. VII. 1906. 4 g mit 0,05 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol gemahlen. Vol. 80; 20 = 1 g.

2. VII. 1906. 20 ccm Emulsionen zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,12 g *ū*.

3. bis 9. VII. 1906. 3 × 20 ccm gegen dieselbe Flüssigkeit] dialysiert. Vol. 192; 64 = 1 g.

10. VII. 1906. 64 ccm klares Filtrat zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,12 g *ū*.

Das Verhalten dieser Organfiltrate gegen Fällungsmittel ist nun ein etwas verschiedenes, je nachdem es sich um die Salzlösungsfiltrate oder die Filtrate nach Sodadialyse handelt. Die Filtrate nach Sodadialyse enthalten mehr Eiweiß und die Fällungsgrenzen ihrer Eiweißkörper gegen alle Fällungsmittel sind nach unten verschoben.

Natives Organplasma fällt meist noch nicht bei $^1/_5$-Sättigung mit Ammonsulfat und mit dem gleichen Volumen einer Lösung von Kaliumacetat in Wasser āā und meist auch nicht mit wenigen Tropfen 10 proz. $CaCl_2$, oder es entstehen bloß leichte Trübungen. Anders bei den nach Sodadialyse gewonnenen Filtraten der zermahlenen Organe: hier erhält man mit $^1/_3$ und $^1/_4$ Volumen, ja gelegentlich bei noch geringerem Zusatz jener Acetatlösung, Trübung und partielle Fällung.

Das Ferment nun war in einem Falle aus einem solchen wirksamen Filtrat durch Zusatz von $^1/_5$ Volumen Acetatlösung und Filtration nicht vollständig niedergeschlagen worden.

Versuch Nr. 92, II (5), A und B, vgl. oben S. 283.

70 ccm Filtrat hatten von Natr. uric. = 0,14 g *ū* zersetzt: 0,13 g *ū*. 129 ccm Filtrat werden mit 23 ccm Acetat gefällt filtriert; die abgepreßte Fällung, wie auch das Filtrat, gegen 0,05 proz. Sodalösung mit 0,08 Proz. Thymol

dialysiert. Die vollständig gelöste Fällung zersetzt von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$: 0,13 g $\bar{u}$. Das Filtrat zersetzt von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$: 0,13 g $\bar{u}$.

2. Werden die durch Vermahlen hergestellten Emulsionen nicht filtriert, sondern zentrifugiert, so erhält man tief opaleszente, in dünner, etwa 1 cm dicker Schicht, aber fast durchsichtige Zentrifugate, welche fermenthaltig sind. Von Interesse ist hier nur das Verhalten der Rinderniere, da wir gesehen haben, daß aus Hundeleber das Ferment vollständig in das Filtrat übergehen kann und somit auch vollständig im Zentrifugat enthalten sein muß (wie es auch alle Versuche gezeigt haben).

Aus nichtextrahierten Pulvern kann das Ferment auch mit 0,8 proz. NaCl-Lösung in das Zentrifugat übergehen.

R. N. P. I (die Niere wurde nicht ausgespült, das Pulver gar nicht extrahiert).

9. I. 1906. 6 g 1/2 Stunde mit gepulvertem Tonteller und 0,8 proz. NaCl-Lösung zerrieben, 1 Stunde bei 40° geschüttelt. Zentrifugat zersetzt von Natr. uric. = 0,125 g $\bar{u}$: 0,12 g $\bar{u}$.

Ist das Pulver aber mit Alkohol extrahiert worden, so geht das Ferment mit 0,8 proz. NaCl-Lösung nicht in das Zentrifugat, z. B.:

Versuch Nr. 32. R. N. P. VI (gemahlen) mit Alkohol extrahiert.

23. V. 1905. 2 g mit 0,8 proz. NaCl-Lösung 1 Stunde bei Zimmertemperatur (Toluol) geschüttelt.

24. V. 1905. Das Zentrifugat zersetzt von Natr. uric. = 0,13 g $\bar{u}$: 0,02 g $\bar{u}$, der Rückstand zersetzt Natr. uric. = 0,13 g $\bar{u}$ restlos.

Dagegen geht das Ferment mit 0,05 Proz. Soda in das Zentrifugat.

Versuch Nr. 41. Dasselbe Präparat wie der vorige Versuch.

6. VI. 1906. 2 g mit 0,8 proz. NaCl-Lösung und 0,05 Proz. Soda gemahlen, sofort zentrifugiert. Das Zentrifugat zersetzt Natr. uric. = 0,13 g $\bar{u}$ restlos, der Rückstand zersetzt Natr. uric. = 0,13 g $\bar{u}$ restlos.

Wie man sieht, ist der Übergang des Fermentes in das Zentrifugat nicht vollständig, er ist es auch dann nicht, wenn man die Extraktion einige Male wiederholt, und jedesmal durch mehrstündiges Schütteln intensiver macht oder längere Zeit im Eisschranke digeriert.

Zum Beispiel:

Versuch Nr. 58. R. N. P. IX bloß mit Toluol extrahiert.

13. X. 1905 aus 3 g mit 0,05 Proz. Soda, 0,4 Proz. NaFl gemahlen, 3 Extrakte (je 24 Stunden im Eisschrank) durch Zentrifugieren hergestellt. Rückstand zersetzt Natr. uric. = 0,13 g $\bar{u}$ restlos.

Versuch Nr. 59. Dasselbe Präparat wie der vorige Versuch.

14. X. 1905 aus 3 g mit 0,05 Proz. Soda, 0,4 Proz. NaFl gemahlen; 5 Extrakte, durch je 24 Stunden in der Kälte hergestellt.

4. und 5. Extrakt zersetzen von Natr. uric. = 0,13 g *ū*: 0,03 g *ū*.

Der Rückstand zersetzt von Natr. uric. = 0,13 g *ū*: 0,07 g *ū*.

Versuch Nr. 61.

16. X. 1905 aus 9 g desselben Präparates werden ebenso 4 Extrakte hergestellt.

Der Rückstand zersetzt Natr. uric. = 0,13 g *ū* restlos.

Versuch Nr. 62.

23. X. 1905 aus 3 g desselben Präparates mit sehr viel Flüssigkeit in derselben Weise 1 Extrakt dargestellt. — Rückstand zersetzt Natr. uric. = 0,13 g *ū* restlos.

Aus 3 g mit sehr viel Flüssigkeit (300 ccm) in derselben Weise 2 Extrakte hergestellt. — Rückstand zersetzt von Natr. uric. = 0,13 g *ū*: 0,08 g *ū*.

Für den Fall, daß man durch Schütteln die Extraktion bewerkstelligt, muß man Chloroformzusatz vermeiden, weil dieses zum Teil durch Eiweißkoagulation den Übertritt des Fermentes in das Zentrifugat hindert.

Viel besser geht die Extraktion mit Karbonat in der Wärme von statten.

Versuch Nr. 43. R. N. P. VI. Toluol und Alkoholextrakt.

10. VI. 1905. 2 g mit Soda gemahlen, 12 Stunden Thermostat bei 40°.

Zentrifugat zersetzt von 0,10 g *ū* alles, Rückstand zersetzt von 0,10 g: 0,02 g *ū*.

Versuch Nr. 65. R. N. P. VIII.

5. XI. 1905. 1 g mit 100 Karbonat und Fluorid 24 Stunden bei 40°; in dieser Weise 2 Extrakte.

Rückstand zersetzt von Natr. uric. = 0,13 g *ū*: 0,06 g *ū*.

Nur muß man hierbei auf die leichte Koagulationsfähigkeit der Emulsionen bei 40° achten (vgl. Pohl, l. c.). Tritt Koagulation ein, so bleibt das gesamte Ferment im Zentrifugenrückstand.

Alle diese Übelstände beseitigt eine vorläufige Dialyse gegen 0,05 Proz. Karbonat; diese bewirkt meist eine Lösung des Fermentes soweit, daß das gesamte Ferment im Zentrifugate zu finden ist. Eventuell kann man hieran eine Extraktion in der Wärme schließen, ohne jetzt Koagulation befürchten zu müssen.

Versuch Nr. 66.

7. XI. 1905. R. N. P. VIII. 6 g mit Karbonat gemahlen und dialysiert, hierauf zweimal je 24 Stunden bei 40° extrahiert.

Zentrifugenrückstand zersetzt von Natr. uric. = 0,13 g *ū*: 0,05 g *ū*.

$^1/_3$ der vereinigten Extrakte zersetzen Natr. uric. = 0,13 g *ū* restlos.

Hierbei ist aber das Antiseptikum von Bedeutung, Dialyse gegen 0,08 Proz. Thymol hindert oft das völlige Übergehen des Fermentes in das Zentrifugat, nicht dagegen Fluorid oder Toluol. Z. B.

Versuch Nr. 111. R. N. P. XIII mit Aceton extrahiert.

9. VII. 1906. 5 g mit 0,05 Proz. Soda und 0,4 Proz. NaFl gemahlen. Volumen 150; 30 ccm = 1 g.

30 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,122 g *ū*: 0,10 g *ū*.

30 ccm dialysiert bis 12. VII. und hierauf zentrifugiert.

Zentrifugat zersetzt von Natr. uric. = 0,123 g *ū*: 0,09 g *ū*.

Der Rückstand zersetzt von Natr. uric. = 0,123 g *ū*: 0,02 g *ū*.

Dagegen:

Versuch Nr. 115. R. N. P. XIII. Einmal mit Aceton extrahiert.

2 g mit 0,05 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol gemahlen, ad 100; 50 ccm = 1 gr.

12. VII. 1906. 50 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,13 g: *ū* 0,11 g *ū*.

15. VII. 1906. 50 ccm 3 Tage gegen dieselbe Flüssigkeit dialysiert.

Zentrifugat zersetzt von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,08 g *ū*.

Rückstand zersetzt von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,09 g *ū*.

Diese Zentrifugatextrakte enthalten das Ferment neben „Plasma" und einem nur zur Opaleszenz löslichen Organeiweiß. (Daß das Ferment aber nicht an diesen kolloiden Körper gebunden ist, geht aus Versuchen hervor, welche opaleszente aber wirkungslose Zentrifugate ergaben, während das Ferment im Zentrifugatrückstand geblieben war). Solche Extrakte filtrieren selbst durch dickes Filterpapier unverändert. — Kieselgur dagegen hält jenen opaleszenten Eiweißkörper und das Ferment aus Rinderniere vollständig zurück, während Ferment aus dialysierter Hundeleber teilweise in das Filtrat übergeht. Aus der verwendeten Kieselgur läßt sich durch Schütteln mit 0,05 Proz. Soda und Zentrifugieren Ferment und ein opaleszent löslicher Eiweißkörper wiedergewinnen. Die auf diese Weise bewerkstelligte Trennung vom Plasma ist aber nicht vollständig, da die Kieselgur auch Plasma in wechselndem Maße zurückhält.

Versuch Nr. 66.

7. XI. 1905. R. N. P. VI. 6 g mit 0,05 Proz. Soda und 0,4 Proz. Fluorid gemahlen. 24 Stunden gegen dieselbe Flüssigkeit dialysiert. 24 Stunden bei

40° gehalten. Zentrifugiert und in derselben Weise noch ein zweites Extrakt hergestellt.

Die vereinigten Zentrifugate 250 ccm.

100 ccm werden durch frisch geglühte und gewaschene Kieselgur, die auf einer Nutsche ausgebreitet ist, filtriert.

Die Kieselgur zersetzt Natr. uric. = 0,13 g *ū* restlos.

Das (wenig eiweißhaltige) Filtrat zersetzt von derselben Menge: 0,04 g *ū*.

80 ccm werden ebenso behandelt und liefern ein Filtrat, welches von Natr. uric. = 0,13 g *ū*: 0,01 g *ū* zersetzt.

Die benutzte Kieselgur wird mit 0,05 Proz. Soda aufgeschüttelt und zentrifugiert. Das Zentrifugat zersetzt Natr. uric. = 0,13 g *ū* restlos.

Versuch Nr. 78, (3. 4).

H. L. P. II mit Toluol gemahlen aber nicht extrahiert; mit 0,05 Proz. Soda und Fluorid gemahlen und dialysiert, später gegen 0,05 proz. Sodalösung mit 0,08 Proz. Thymol dialysiert. 50 ccm = 2 g.

9. II. 1906. 50 ccm Zentrifugat zersetzen Natr. uric. = 0,14 g *ū* restlos.

14. II. 1906. 50 ccm Zentrifugat durch Kieselgur filtriert. Das Filtrat zersetzt von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,06 g *ū*.

Während das „Plasma“ gewöhnlich mit Chlorcalcium keine Fällung gibt, fallen die Zentrifugatextrakte ausnahmslos, ob sie wirksam oder unwirksam sind, mit geringen Mengen 10 proz. $CaCl_2$-Lösung. Die Fällungen enthalten das Ferment; die Fraktionierung ist aber, im Falle man die Fällung durch Zentrifugieren abtrennt, keine vollständige, da im Zentrifugat auch einiges Ferment noch zurückbleibt. — Diese $CaCl_2$-Fällung erwies sich bei Rinderniere als vollständig unlöslich, während bei Hundeleber mit Karbonat wirksame opaleszente Zentrifugate erhalten wurden.

Versuch Nr. 58. R. N. P. IX.

13. X. 1905. 3 g mit 0,05 Proz. Soda und 0,4 Proz. NaFl gemahlen, 6 Stunden Eisschrank, zentrifugiert. — Das Zentrifugat mit 3 ccm 10 Proz. $CaCl_2$ auf 100 gefällt.

Fällung zentrifugiert, zersetzt von Natr. uric. = 0,13 g *ū*: 0,08 g *ū*.

Das Zentrifugat zersetzt von Natr. uric. = 0,13 g *ū*: 0,04 g *ū*.

Versuch Nr. 59. Dasselbe Präparat.

12. X. bis 18. X. 1905. Aus 3 g in derselben Weise 3 Extrakte hergestellt, mit 9 ccm 10 proz. $CaCl_2$ gefällt.

Fällung zentrifugiert zersetzt Natr. uric. = 0,13 g *ū* restlos.

Das Zentrifugat zersetzt von Natr. uric. = 0,13 g *ū*: 0,08 g *ū*.

Versuch Nr. 61. Dasselbe Präparat.

16. X. 1906. Von 9 g werden in derselben Weise 2 Extrakte hergestellt und mit $CaCl_2$ (10 Proz.) (15 ccm auf 350 ccm Extrakt) gefällt.

$^1/_3$ des Zentrifugates von der $CaCl_2$-Fällung zersetzt von Natr. uric. = 0,13 g $\bar{u}$: 0,07 g $\bar{u}$.

Die Fällung gibt mit 0,05 Proz. Soda nach 24 Stunden Eisschrank ein Zentrifugat, welches von Natr. uric. = 0,13 g $\bar{u}$: 0,05 g $\bar{u}$ zersetzt; ebenso mit 1 Proz. Leimlösung behandelt, zersetzt das Zentrifugat von Natr. uric. = 0,13 g $\bar{u}$: 0,04 g $\bar{u}$.

28. X. 1906. $^1/_3$ der ungelösten Fällung zersetzt Natr. uric. = 0,13 g $\bar{u}$ restlos.

Versuch Nr. 78. H. L. P. II.

Dialysierte Emulsion (vgl. S. 259) 50 ccm = 2 g.

9. II. 1906. 50 ccm Zentrifugat zersetzen Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$ restlos.

50 ccm Zentrifugat mit 12 ccm $CaCl_2$ von 10 Proz. gefällt. Fällung zentrifugiert und durch Schütteln mit 0,05 proz. Sodalösung und Zentrifugieren zweimal extrahiert; es bleibt nur ein geringfügiger Rückstand.

Die Extrakte zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$: 0,12 g $\bar{u}$.

Durch Ammonsulfat werden die Zentrifugate selbstredend auch gefällt und zwar durch weit niedrigere Konzentrationen als das Plasma; die Fällungen sind bei der Dialyse wieder zu einer opaleszenten Flüssigkeit löslich. In Fällen, wo das Ammonsulfat ohne schädigenden Einfluß auf das Ferment geblieben war, haben wir gesehen, daß das Ferment mit dem Niederschlage ausfällt und sich demnach vom Plasma trennen läßt; ähnlich aber wie beim Verhalten gegen $CaCl_2$ entgeht ein Teil des Fermentes der Fällung, wenn man diese durch Zentrifugieren abtrennt. Vgl. oben Versuch Nr. 64, S. 276 und 277.

Das Verhalten der Zentrifugate gegen Kaliumacetatlösung ($\bar{a}\bar{a}$) ist ein ähnliches. Niedrige Konzentrationen, welche schon deutlich ausflocken, ohne völlig zu klären, schlagen das Ferment nicht nieder, wenn die Fällung durch Zentrifugieren abgetrennt wird. Filtriert man dagegen, so bleibt das Ferment bei Fällung mit noch weniger Acetat auf dem Filter, wiewohl die Ausflockung das Zentrifugat auch nicht geklärt hat. Die Plasmaeiweißkörper gehen in das Filtrat über.

Versuch Nr. 105, II. H. L. P. X. ($^1/_{17}$ Vol. Acetat.)

Mit Soda-Thymol gemahlen, dialysiert und zentrifugiert. 50 ccm = 1 g.

3. VII. 1906. 50 ccm Zentrifugat zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$: 0,12 g $\bar{u}$.

4. VII. 1906. 50 ccm + 3 ccm Acetatlösung. Fällung zentrifugiert und ebenso wie das opaleszente Zentrifugat dialysiert.

Die Fällung zersetzt von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$: 0,04 g $\bar{u}$.

Das Zentrifugat zersetzt von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$: 0,11 g $\bar{u}$.

7. bis 8. VII. 1906. ($^1/_{10}$ Vol. Acetat.) 250 ccm Zentrifugat + 25 ccm Acetat 24 Stunden gestanden, dann filtriert. Rückstand abgepreßt und dialysiert. Volumen 100 ccm; 20 ccm = 1 g.

20 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$ — 0,12 g $\bar{u}$.

Mit Rindernierenzentrifugaten haben wir diese Versuche noch nicht gemacht.

Versuch Nr. 78 (8, 3.) H. L. P. II. ($^1/_{25}$ Acetat.)

Emulsion dialysiert gegen 0,05 proz. Sodalösung mit 0,4 Proz. NaFl und 0,08 Proz. Thymol. 50 ccm = 2 gr.

3. 9. II. 1905. 50 ccm Zentrifugat zersetzen Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$ restlos.

8. 5. III. bis 6. III. 1906. 50 ccm Zentrifugat mit 2 ccm Acetatlösung gefällt, filtriert und mit der gleichen Lösung ausgewaschen. Rückstand, 6. III. bis 9. III. gegen 0,05 proz. Sodalösung mit 0,4 Proz. Fluorid dialysiert (völlige Lösung zur Opaleszenz), zersetzt Natr. uric. = 0,14 g $\bar{u}$ restlos.

Insbesondere auf die letztere Weise kann man aus den wirksamen Zentrifugaten die Plasmaeiweißkörper entfernen und hat dann das Ferment in der opaleszenten Lösung jenes nicht filtrierbaren Organeiweißes. Ob man auf irgend eine Weise diese letztere daraus entfernen kann, etwa durch fraktionierte Fällung und Zentrifugieren, oder durch Niederschlagen des Fermentes mit einer anorganischen Fällung, haben wir noch nicht untersucht.

3. Wir sind aber auf einem anderen Wege dahingelangt, fast völlig eiweißfreie, auch von allen Extraktstoffen freie Lösungen zu erhalten, die die volle Wirksamkeit des Ausgangsmaterials besitzen. Vorläufig sind diese Versuche nur mit Hundeleber zu Ende geführt.

Auch die gegen Karbonat dialysierten Ausgangsemulsionen geben mit eiweißfällenden Reagenzien gut filtrierbare Ausflockungen, welche, abfiltriert, das Ferment vollständig enthalten.

Durch Umfällen und Filtrieren erhält man bald eiweiß- und farbstofffreie Filtrate. Durch Abpressen und Dialyse wird der letzte Rest des Fällungsmittels entfernt und man hat zum Schlusse Organemulsionen, welche frei von Plasma, Salzen und wasserlöslichem Extrakt sind. Diese Emulsionen haben die volle Wirksamkeit des Ausgangsmateriales, sind haltbar und eignen sich so wegen ihrer vorzüglichen Reinheit zu allen Fermentversuchen.

Als Fällungsmittel kommt nach den Ergebnissen des vorigen Abschnittes vorläufig nur eine Lösung von Kaliumacetat in Wasser zu gleichen Teilen in Betracht. Die zuzusetzenden Mengen, die nötig sind, um gut filtrierbare Ausflockungen zu bekommen, kein Ferment zu verlieren und alles Plasmaeiweiß zu entfernen

(d. h. nicht Plasma mit niederzuschlagen), sind nicht immer gleich. Reinigten wir die Fällung durch Umfällen, so ging bei Fällung mit $^1/_{20}$ Volumen Acetatlösung das Ferment völlig verloren (reinigten wir durch Waschen auf dem Filter, so blieb es auch bei Fällung des Zentrifugats mit $^1/_{25}$ Volumen Acetat vollständig im Rückstande. Vgl. oben S. 290.). Durch Fällen und Umfällen mit $^1/_2$, $^1/_4$ und $^1/_{10}$ Volumen Acetat erhielten wir stets vollwirksame Endprodukte. Die Fällungsgrenzen sind etwas andere (höhere) als in den Zentrifugaten, wohl deswegen, weil sich auch der durch die Zentrifuge trennbare Rückstand an der Fällung beteiligt. Wenn man auch genötigt ist, die erste Fällung mit höheren Konzentrationen vorzunehmen, so gelingen die weiteren stets mit $^1/_{10}$ Volumen und weniger. In gleicher Weise kann man die Fällungen in den nicht dialysierten Emulsionen vornehmen, doch ist das weniger zweckmäßig, da die Dialyse sehr lösend wirkt und schließlich, zur Entfernung des Fällungsmittels angewendet, noch etwas in Lösung gehen läßt, was das Endprodukt verunreinigt, aber nach vorläufiger Dialyse bei der Fällung entfernt wird. Ganz analog den Erfahrungen, die wir bei der Fällung der Zentrifugate gemacht hatten, zeigte es sich auch hier, daß bei Abtrennung der Fällungen durch die Zentrifuge ein Teil des Fermentes mit dem Zentrifugate verloren geht.

Reinigung durch Umfällen und Filtrieren.

Versuch Nr. 82. R. N. P. XII A.

6. III. 1906. 20 g mit 0,05 Proz. Soda und 0,4 Proz. NaFl gemahlen.

6. III. bis 12. III. 1906. Dialyse gegen dieselbe Flüssigkeit. Volumen 710 versetzt mit 70 ccm Kaliumacetatlösung. Da die Filtration nicht rasch genug vonstatten geht, wird das Filter durchgestoßen und die Emulsion mit $^1/_2$ Volumen Acetat gefällt, filtriert und mit $^1/_{20}$ Volumen nachgewaschen.

13. III. 1906. Vom Filter genommen, in 400 ccm 0,05 proz. Sodalösung verteilt, mit 60 ccm Acetat gefällt und filtriert. Im Filtrat noch Eiweiß; über Nacht mit einer gleich konzentrierten Lösung gewaschen.

14. III. 1906. Vom Filter genommen, in 0,05 proz. Sodalösung verteilt und mit $^1/_2$ Volumen Acetat gefällt und filtriert. Filtrat: eiweißfrei. Der Rückstand gegen 0,05 proz. Sodalösung mit 0,08 Proz. Thymol dialysiert bis 18. III. 1906. Endvolumen 550; 27 ccm = 1 g.

18. III. 30 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,13 g *ū*.

Versuch Nr. 83. H. L. P. III.

14. III. 1906. 20 g mit 0,05 Proz. Soda und 0,4 Proz. NaFl gemahlen.

15. III. bis 16. III. Dialyse. Volumen 500.

17. III. Mit 250 Acetatlösung versetzt und bis 18. III. stehen gelassen.

18. III. Filtration und Waschen mit $^1/_3$ Volumen Acetat.

19. III. Waschen mit $^1/_3$ Volumen Acetat.

20. III. Vom Filter genommen, in 0,05 proz. Sodalösung mit 0,08 Proz. Thymol verteilt, mit $^1/_2$ Volumen Acetat gefällt. Filtrat eiweißfrei. Rückstand abgepreßt mit 0,05 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol gemahlen.

21. III. Dialyse gegen dieselbe Flüssigkeit.

25. III. Endvolumen 1000; 50 ccm = 1 g.

26. III. 50 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,11 g *ū*.

27. III. 100 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,14 g *ū*.

Versuch Nr. 89. H. L. P. IV.

29. IV. 1906. 10,9 g mit 0,05 Proz. Soda und 0,08 Proz. NaFl gemahlen.

30. IV. bis 4. V. 1906. Dialyse.

5. V. Mit $^1/_5$ Volumen Acetat gefällt, filtriert, die Fällung mit Sodalösung gemahlen, 750 ccm.

6. V. Mit $^1/_{10}$ Volumen gefällt usw. wie gestern. Volumen 1000.

7. V. Mit $^1/_{20}$ Volumen gefällt usw. wie am vorigen Tage. Volumen 1000.

8. V. Mit $^1/_{20}$ Volumen gefällt usw. wie am 7. V. Volumen 100.

9. V. bis 11. V. Dialyse. Endvolumen 1000; 100 ccm = 1 g.

11. V. 100 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,04 g *ū*.

15. V. 200 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,04 g *ū*.

Versuch Nr. 103. H. L. P. X.

26. VI. 1906. 5 g mit 0,8 Proz. NaCl, 0,05 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol gemahlen.

27. VI. Volumen 200 ccm, darin 25 g Kaliumacetat in Substanz gelöst. — Fällung, Filtration.

28. VI. Vom Filter genommen und mit 0,05 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol gemahlen.

29. VI. Mit $^1/_4$ Volumen Acetatlösung gefällt, filtriert, Rückstand, wie gestern gemahlen.

30. VI. Ebenso.

1. VII. Ebenso. Im Filtrat kein Eiweiß, farblos.

3. VII. bis 7. VII. Dialyse. Volumen 265; 53 ccm = 1 g.

7. VII. 53 ccm zentrifugiert. Zentrifugat zersetzt von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,10 g *ū*.

Rückstand zersetzt von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,02 g *ū*.

Versuch Nr. 102 als Kontrolle. H. L. P. X.

25. VI. 10 g gemahlen ad 200.

26. VI. 20 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,11 g *ū*.

Umfällen und Zentrifugieren.

Versuch Nr. 106. H. L. P. X.

27. VI. 1906. 6 g mit 0,05 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol gemahlen.

28. VI. Volumen 180 ccm, mit 60 g Acetatlösung gefällt, zentrifugiert. Zentrifugat trübe. Rückstand mit 0,05 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol gemahlen.

29. VI. Ebenso. Zentrifugat klar.

30. VI. Ebenso. Zentrifugat klar.

2. VII. Ebenso filtriert, abgepreßt, gemahlen.

3. VII. bis 7. VII. Dialyse gegen 0,05 proz. Sodalösung und 0,08 Proz. Thymol. Volumen 300; 50 ccm = 1 g.

7. VII. 50 ccm zentrifugiert. Zentrifugat zersetzt von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,05 g *ū*.

Rückstand zersetzt von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,02 g *ū*.

Kontrolle wie zum vorigen Versuche.

Aus diesen nun plasmafreien und wieder dialysierten Emulsionen geht das Ferment vollständig in das Zentrifugat oder Filtrat über. Während das Zentrifugat trüb opaleszent ist und auch so filtriert, ist das Filtrat der Emulsion klar; der beim Zentrifugieren abgetrennte Rückstand verhindert hier offenbar das Durchtreten des opaleszent löslichen Eiweißkörpers. So erhält man, wie insbesondere Versuch 103 (s. unten) zeigt, die gesamte zersetzende Potenz des Ausgangsmateriales in ein so gut wie eiweißfreies Filtrat. Dieser Befund gilt vorläufig nur für Hundeleber, für die Rinderniere ist dieser letzte Teil der Darstellung noch nicht versucht worden.

Versuch Nr. 98. H. L. P. III.

7,8 g durch Waschen mit NaCl-Lösung plasmafrei, hierauf gegen 0,05 proz. Sodalösung mit 0,08 Proz. Thymol dialysiert, filtriert.

15. VI. 1906. 100 ccm klares Filtrat[1]) = 2 g zersetzen Natr. uric. = 0,14 g *ū* restlos.

50 ccm = 1 g der nicht filtrierten dialysierten Emulsion zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,08 g *ū*.

Versuch Nr. 103. H. L. P. X.

5 g durch Acetatfällung in 0,05 proz. Sodalösung plasmafrei, hierauf dialysiert und filtriert. 53 ccm = 1 g. (Filtrat enthält fast gar kein Eiweiß, Spur Trübung beim Kochen mit HCl.)

8. VII. 1906. 53 ccm Filtrat zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,09 g *ū*.

100 ccm zersetzen von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,11 g *ū*.

Kontrolle: 1 g Ausgangsmaterial, Versuch Nr. 102, zersetzt von Natr. uric. = 0,14 g *ū*: 0,11 g *ū*.

Zusammenfassung.

1. Das harnsäureoxydierende Ferment ist nicht im Organplasma, sondern in einer nur aus den zertrümmerten Zellen durch Zentrifugieren zu gewinnenden opaleszenten Organfraktion enthalten.

---

[1]) Dieses Filtrat enthält frisch in Lösung gegangenes Eiweiß, weil die vorläufige Dialyse gegen Sodalösung bei der Plasmaentfernung nicht in Anwendung kam.

2. Durch Dialyse gegen schwache Sodalösungen werden die zermahlenen Organe so weit aufgeschlossen, daß das Ferment völlig in Lösung geht. Durch Fällen solcher dialysierten Emulsionen mit niedrigen Konzentrationen von Kaliumacetat lassen sich die gelösten Eiweißkörper von jener nur opaleszent löslichen und einer unlöslichen Organfraktion durch Filtration trennen. Die Fällung enthält das Ferment, welches nach neuerlicher Dialyse dieser Fällung in fast eiweißfreier Lösung quantitativ in das Filtrat übergeht (Hundeleber), oder ebenso vollständig durch die Zentrifuge in opaleszenter Lösung erhalten werden kann (Rinderniere).

Abgeschlossen im Juli 1906.

XX.

Die Produkte der fermentativen Harnsäurezersetzung durch tierische Organe.

Von Priv.-Doz. Dr. **Wilhelm Wiechowski**, Assistenten am Institute.

Aus dem pharmakologischen Institute der deutschen Universität Prag.

1.

Über den Abbau der Harnsäure durch chemische Eingriffe in vitro ist folgendes ermittelt:

1. In saurer Lösung entsteht aus Harnsäure bei gemäßigter Oxydation (durch Salpetersäure oder Kaliumchlorat und Salzsäure in der Kälte) Alloxan (Mesoxalylharnstoff) und Harnstoff:

$$\begin{array}{l} NH{-}CO \\ \;| \qquad | \\ CO \quad C{-}NH\diagdown \\ \;| \qquad \| \qquad\quad\; CO \\ NH{-}C{-}NH\diagup \end{array} + H_2O + O \longrightarrow \begin{array}{l} NH{-}CO \\ \;| \qquad | \\ CO \quad CO \\ \;| \qquad | \\ NH{-}CO \end{array} + \begin{array}{l} NH_2\diagdown \\ \qquad\quad CO \\ NH_2\diagup \end{array}$$

bei heftiger Oxydation (durch heiße Salpetersäure) bildet sich neben Alloxan auch Parabansäure (Oxalylharnstoff):

$$\begin{array}{l} CO{-}NH\diagdown \\ \;| \qquad\qquad CO. \\ CO{-}NH\diagup \end{array}$$

2. In alkalischer Lösung geht die Harnsäure bei Oxydation durch Permanganat zunächst in ein Zwischenprodukt über, welches beim Einengen in essigsaurer Lösung Allantoin, beim Einengen in alkalischer Lösung Uroxansäure liefert (E. E. Sundwik[1]).

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 41, 343—347.

Da nach Rob. Behrend[1]) die Uroxansäure als Diureïdomalonsäure aufzufassen ist, kann man sich dieses hypothetische Zwischenprodukt durch Hydrolyse folgendermaßen aus Harnsäure hervorgegangen denken. (Diese Konstitution gestattet auch die Ableitung des durch M. Scholz[2]) mittels Wasserstoffperoxyd aus Harnsäure zu etwa 10 Proz. dargestellten Tetracarbonimid)

```
                           NH—CO
                           |   |
                           CO  C—NH\
                           |   ||    >CO
                           NH—C—NH/
   H                        + H2O
   O                         |
   O                         v
   C                    / NH COOH              \        NH2
   |                    |  | \ |                |        |
NH—C—NH <—— O +         | CO   C——NH\           | + O —> CO  CO—NH\
|  |  |        H2O      |  |   |      >CO       |        |   |      >CO
CO C  CO                \ NH—CH—NH/             /        NH—CH—NH/
|  O  |                   + 3 O                                   + CO2
NH2 O NH2                    |                            Allantoin
    H                        v
Uroxansäure             NH—CO—NH
                        |      |
                        CO     CO + H2O + CO2
                        |      |
                        NH—CO—NH
                        Tetracarbonimid.
```

3. Der weitere Abbau dieser Zersetzungsprodukte geht dann in der Weise vor sich: Aus Alloxan entsteht durch fortschreitende Hydrolyse Alloxansäure, Mesoxalsäure und Harnstoff.

```
NH—CO                 NH—CO                NH2        COOH
|   |                 |   |                |          |
CO  CO + H2O —> CO    CO + H2O —> CO   +   CO
|   |                 |   |                |          |
NH—CO                 NH2 COOH             NH2        COOH
(Alloxan)           (Alloxansäure)      (Harnstoff) (Mesoxalsäure)
```

Aus Parabansäure entsteht auf dieselbe Weise: Oxalursäure, Oxalsäure und Harnstoff.

```
NH—CO               NH—CO                  NH2
|   |               |   |                  |        COOH
CO  |  + H2O —>     CO  |     + H2O —>     CO   +   |
|   |               |   |                  |        COOH
NH—CO               NH2 COOH               NH2
(Parabansäure)     (Oxalursäure)         (Harnstoff) (Oxalsäure)
```

[1]) Über die Oxydation der Harnsäure in alkalischer Lösung. Ann. d. Chem. u. Pharm. 333, 141—160, zitiert nach Jahrb. f. Tierchem. 34.

[2]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 34, 4130—4132, zitiert nach Jahrb. f. Tierchem. 30, 126.

Aus Allantoin geht ebenfalls durch Hydrolyse Allantoinsäure, und dann Glyoxylsäure und Harnstoff hervor (L. J. Simon[1]).

```
NH2                              NH2
|                                |
CO   CO—NH\         + H2O ——> CO    COOH  NH2\
|    |      >CO                  |     |          >CO
NH—CH—NH/                        NH—CH——————NH/
   (Allantoin)                      (Allantoinsäure)

                                   NH2
                     COOH          |
      + H2O ——>      |        + 2 CO
                     CHO           |
                                   NH2
                 (Glyoxylsäure)  (Harnstoff)
```

Andererseits erhält man aus Allantoin durch Salpetersäure Allantursäure. Die Uroxansäure liefert über Oxonsäure Glyoxylharnstoff

```
   /NH—CO
CO      |
   \NH—CH—OH
```

Als Endprodukte dieses hydrolytischen und oxydativen Abbaues ergeben sich demnach einerseits Harnstoff, Mesoxalsäure Kohlensäure und Oxalsäure; andererseits: Harnstoff, Kohlensäure und Glyoxylsäure.

Zu den Endprodukten Harnstoff und Oxalsäure gelangten viele Autoren auch unmittelbar durch Verwendung verschiedener Oxydationsmittel. So erhielt Salkowski[2]) durch Eisenchlorid aus Harnsäure Harnstoff und Oxalsäure; Tocher[3]) durch Chromsäure Harnstoff und jüngst verteidigt wieder Richter[4]) den durch Falta[5]) widerlegten quantitativen Übergang von Harnsäure durch Permanganat in saurer Lösung in Harnstoff (Jolles). Außerdem beobachtete Torg. Gigli[6]) eine spontane Umwandlung von Harnsäure in Harnstoff in einer ein Jahr alten Lösung.

4. Das Allantoin geht aber andererseits durch Reduktion mit HJ entweder in Glykoluril:

---

[1]) Sur les uréides glyoxyliques: Allantoïne et acide allantoïque. Compt. rend. **138**, 425—428, zitiert nach Jahrb. f. Tierchem. 34.

[2]) Pflügers Arch. 2, 958.

[3]) Phys. Journ. **15**, 174, zitiert nach Jahrb. f. Tierchem. 32/33.

[4]) Zitiert nach Jahrb. f. Tierchem. 33, 112; vgl. auch Plot, ebenda 32, 117.

[5]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. **34**, 2674.

[6]) Chem. Journ. 25, 741, zitiert nach Jahrb. f. Tierchem. 30.

$$CO\begin{matrix}\diagup NH-CH-NH\diagdown \\ \diagdown NH-CH-NH\diagup\end{matrix}CO$$

(einem Analogon zum Tetracarbonimid), oder in Harnstoff und Hydantoin über, welch letzteres durch fortschreitende Hydrolyse zunächst Hydantoinsäure und weiter Glykokoll, Ammoniak und Kohlensäure liefert.

$$\begin{matrix} NH_2 & & \\ | & & \\ CO & CO-NH & \\ | & | & \!\!>CO \\ NH- & CH-NH & \end{matrix} + 2H \longrightarrow \begin{matrix} NH_2 \\ | \\ CO \\ | \\ NH_2 \end{matrix} + \begin{matrix} CO-NH & \\ | & \!\!>CO \\ CH_2-NH & \end{matrix}$$

(Allantoin) (Harnstoff) (Hydantoin)

$$\begin{matrix} CO-NH & \\ | & \!\!>CO \\ CH_2-NH & \end{matrix} + H_2O \longrightarrow \begin{matrix} COOH & NH_2 & \\ | & & \!\!>CO \\ CH_2 & \!\!-\!\!-\,NH & \end{matrix}$$

(Hydantoin) (Hydantoinsäure)

$$+ H_2O \longrightarrow \begin{matrix} COOH \\ | \\ CH_2-NH_2 \end{matrix} + CO_2 + NH_3$$

(Glykokoll)

Dieselben Endprodukte: Glykokoll, Ammoniak und Kohlensäure erhielt Strecker[1]) direkt durch Spaltung der Harnsäure mit Chlor- oder Jodwasserstoff im Einschmelzrohre.

Der Stickstoff der Harnsäure wird also schließlich entweder als Harnstoff oder als Glykokoll und Ammoniak erhalten, je nachdem der Abbau des Allantoins bloß durch Hydrolyse oder durch Reduktion mit nachfolgender Hydrolyse erfolgt. — Bei der Oxydation in saurer Lösung wird zunächst der Hydantoinring (Imidozolring) der Harnsäure gesprengt (Abspaltung von Harnstoff), bei der Oxydation in alkalischer Lösung dagegen der Pyrimidinring (Allantoinbildung und CO_2-Abspaltung).

Der Kohlenstoff der Harnsäure wird schließlich entweder als Mesoxalsäure bzw. Kohlen- und Oxalsäure, oder als Kohlen- und Glyoxylsäure erhalten. Doch ist hierbei ein oxydativer Abbau des Allantoins nicht ins Auge gefaßt, über welchen ich bis auf die wenig studierte Allantursäure keine Angaben habe finden können.

Als oxydativer Abbau der Harnsäure anderer Art wäre noch der von L. Hugounenq[2]) zu erwähnen. Nach diesem Autor zerfällt Harnsäure durch Ammoniumpersulfat in Allantursäure, Harnstoff und Glykokoll.

---

[1]) Ann. d. Chem. u. Pharm. **146**, 142 (1868).

[2]) De l'action oxydante du persulfate d'ammoniaque sur quelques principes immédiats de l'organisme. Compt. rend. **132**, 91—93, zitiert nach Jahrb. f. Tierchem. 30, 430.

2.

Das Studium des biochemischen Abbaues der Harnsäure hat folgendes ergeben:

1. Ulpiani[1]) gelang es, ein Bacterium acidi urici zu isolieren, welches Harnsäure glatt in 3 CO_2 und 2 Harnstoffe zerlegt. Diese Gärungsarbeit besteht nach Ulpiani[2]) wesentlich in der Oxydation der dreigliedrigen C-Kette, während die hydrolytische Harnstoffabspaltung bloß als vorbereitender Akt, als Anpassung des Bakteriums an das Substrat, anzusehen ist.

2. Der Säugetierorganismus vermag eingeführte oder in ihm entstehende Harnsäure zu zerlegen (Wöhler und Frerichs, Neubauer, Meissner, Weintraud usw.[3]); andererseits behauptet aber O. Loewi[4]) die Unangreifbarkeit der im Körper entstehenden Harnsäure (vgl. auch hierzu: Soetbeer und Jussuf Ibrahim, Zeitschr. f. phys. Chem. 35, 1—7, welche beim Menschen keine Harnsäurezersetzung finden konnten).

Über die Endprodukte einer solchen vitalen Harnsäurezersetzung ist folgendes bekannt: Frerichs und Wöhler[5]) nahmen das Allantoin als hauptsächliches Zersetzungsprodukt an. Das gleiche schloß später Salkowski[6]) aus dem Ausfalle seiner Harnstoffbestimmungen beim Hunde. L. B. Mendel und E. W. Brown[7]) fanden bei der Katze Allantoinausscheidung nach Harnsäurezufuhr. Trotz nicht sehr deutlich ausgefallener Versuche glaubt auch E. Swain[8]) an die Bildung von Allantoin aus Harnsäure im Körper des Hundes. Dagegen konnte Poduschka[9]) und später Pohl[10]) beim Hunde nach Zufuhr mäßiger Mengen Harnsäure keine Allantoinvermehrung im Harne nachweisen, wiewohl eingeführtes Allantoin quantitativ ausgeschieden wurde. E. Sal-

---

[1]) Atti della R. Accademia dei Lincei **12**, 236—240, zitiert nach Jahrb. f. Tierchem. 33.

[2]) Rendiconti della Soc. chim. di Roma 1904, 140—144.

[3]) Die Literatur siehe bei H. Wiener: Die Harnsäure, Ergebn. d. Phys., Asher-Spiro 1902, I, 1.

[4]) Beiträge zur Kenntnis des Nukleïnstoffwechsels, I. Mitteil. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. **44**, 1 (1900).

[5]) l. c.

[6]) B. B. **9**, 719.

[7]) Am. Journ. of Phys. **3**, 261—270, zitiert nach Jahrb. d. Tierchem. 30, 761.

[8]) Ebenda **6**, 38—47, zitiert nach Jahrb. f. Tierchem. 30.

[9]) Arch. f. experim. Path. u. Pharm. **44**, 59 (1900).

[10]) Ebenda **48**, 367 (1902).

kowski[1]) fand beim Hunde, daß Harnsäure zum Teil als Allantoin, zum Teil als Harnstoff ausgeschieden wird, beim Kaninchen dagegen konnte er nur Harnstoff als Zersetzungsprodukt der Harnsäure nachweisen. Auch L. B. Mendel und B. White[2]) fanden neuerdings nach intravenöser (namentlich intraportaler) Zufuhr von Harnsäure Allantoinausscheidung beim Hunde, weniger bei der Katze, gar nicht beim Kaninchen.

Die Oxalsäure wird für den Menschen als Spaltungsprodukt der Harnsäure von Klemperer und Tritscher[3]) abgewiesen, für Kaninchen und Hund war die durch Gaglio[4]) und Pohl[5]) festgestellte Unzerstörbarkeit der Oxalsäure schon früher ein Hindernis für diese Annahme.

H. Wiener[6]) hat endlich aus zwei Kaninchenversuchen den Schluß gezogen, daß die Harnsäure im Körper unter Glykokollbildung zersetzt werde und resumiert in seiner Zusammenfassung[7]) im Jahre 1902 den damaligen Stand der Frage dahin: „Es ist demnach weder die Oxalsäure noch das Allantoin, sondern vorläufig allein das Glykokoll als Zersetzungsprodukt der Harnsäure im Körper erwiesen.“ Mittlerweile habe ich zeigen können[8]), daß die Schlüsse Wieners bezüglich der Glykokollbildung nicht zwingend sind, da der sogenannte „Glykokollvorrat pro Kilo Kaninchen“ (gemessen an der nach Benzoesäurezufuhr ausgeschiedenen Hippursäuremenge), auf dessen Tatsächlichkeit jene Schlüsse beruhen, nicht zu Recht besteht. Außerdem konnte ich aber eine Glykokollvermehrung in einem Versuche mit mäßiger Harnsäurezufuhr am Kaninchen (mittels Benzoesäurezufuhr und Hippursäurebestimmung) nicht nachweisen. Schließlich gibt Almagia[9]) an, im Kaninchenharn nach reichlicher Zufuhr von Harnsäure Glyoxylsäure gefunden zu haben. — Das Schicksal der Harnsäure im Säugetierkörper ist somit noch immer nicht endgültig festgestellt.

3. Die gleiche Unsicherheit besteht bezüglich der Produkte der fermentativen Harnsäurezersetzung durch tierische Organe.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 35, 494—500, zitiert nach Jahrb. f. Tierchem. 32, 151.

[2]) Am. Journ. of Phys. 12, 85—94, zitiert nach Jahrb. f. Tierchem. über 1904.

[3]) Zeitschr. f. kl. Med. 44 (1902).

[4]) Annal. di chim. e di farmac. IV, Ser. 4, p. 156—178.

[5]) Arch. f. experim. Path. u. Pharm. 37, 413 (1897).

[6]) Ebenda.

[7]) Ergebn. d. Phys. Asher, Spiro 1902 I.

[8]) Wiechowski, Die Ges. d. Hippursäuresynthese; diese Beiträge.

[9]) Diese Beiträge 7, 460 (1905).

Diese zuerst von Stokvis [1]) beobachtete Zersetzung wurde in der Folge von Chassevant et Richet [2]), Ascoli [3]), Wiener [4]) und Cipollina [5]) auch mit Rücksicht auf die hierbei auftretenden Produkte studiert. Chassevant und Richet stützten sich auf die schon früher von Richet beobachtete Harnstoffbildung in der überlebenden Leber und schlossen aus Versuchen, in denen die Eiweißstoffe und zugesetzte Ammonsalze unverändert geblieben waren, zugesetzte Harnsäure dagegen nicht wieder gefunden wurde, daß die Quelle jener Harnstoffbildung in überlebenden Organen die Harnsäure sei. Sie arbeiteten unter annähernd anaeroben Bedingungen (Stehenlassen der Proben bei 40° verschieden lange Zeit). Auch Ascoli kommt zu dem Schlusse, daß die Harnsäure beim Durchbluten überlebender Hundeleber zu Harnstoff abgebaut werde. (Er bestimmte die Zunahme des „Harnstoff-N" in der Durchströmungsflüssigkeit nach Pflüger-Schöndorff und fand sie entsprechend dem Stickstoff der zugesetzten Harnsäure.) Dagegen hat Subkow [6]) nach anaerober Zersetzung der Harnsäure durch Hundeleber Harnstoff isolieren können. Wiener versuchte, in der Zersetzungsflüssigkeit (erhalten durch vierstündiges Schütteln von Harnsäure mit Rindernierenkolatur) das von ihm als Zersetzungsprodukt supponierte Glykokoll nachzuweisen, indem er nach Koagulation der Eiweißkörper die eingeengten Filtrate zweier gleicher Proben benzoylierte, die gebildete freie Benzoesäure entfernte, in dem Rest die gebundene Benzoesäure durch Verseifen und Ausschütteln isolierte und zur Wägung brachte. Die Differenz in der so bestimmten gebundenen Benzoesäure zwischen einer Zersetzungs- und einer blinden Probe bezog er auf Glykokoll. Die Vorprobe zersetzte 0,2116 Harnsäure; die gleich lange geschüttelte Hauptprobe ergab ihr gegenüber ein Plus von 0,07 gebundener Benzoesäure (was 0,046 Glykokoll entsprechen würde). Aus diesem Resultate wurde der Schluß gezogen, daß wenigstens ein Teil der Harnsäure durch das Organferment in Glykokoll übergeführt werde. Jacoby hält dagegen in seiner gleichzeitig mit der Wienerschen erschienenen Publikation dafür, daß das Zersetzungsprodukt der Harnsäure durch

---

[1]) Vgl. hierzu die vorhergehende Arbeit, dort auch die Literatur.

[2]) Compt. rend. de la Soc. de Belge 1897, p. 743.

[3]) Pflügers Arch. 72, 340 (1898).

[4]) Arch. f. experim. Path. u. Pharm. 42, 375 (1899).

[5]) Berl. klin. Wochenschr. 1901, S. 544.

[6]) Diss. Moskau 1903, zitiert nach Jahrb. f. Tierchem. 33, 873.

Hundeleber Allantoin sei, wohl deswegen, weil er den Zersetzungsvorgang, analog seinen Versuchen mit Salicylaldehyd, als Oxydation auffaßt. Cipollina fand in verschiedenen Harnsäurezersetzungsversuchen mit überlebenden Organen nach Extraktion mit salzsaurem Wasser mehr Oxalsäure als in Kontrollproben ohne Harnsäure und schließt daraus, daß Milz, vielleicht auch Leber und Muskel imstande sind, aus Harnsäure durch Oxydation Oxalsäure zu bilden. Schließlich berichtet Almagia (l. c.) über das Auftreten von Glyoxylsäure bei der Harnsäurespaltung durch verschiedene überlebende Organe.

Überblickt man diese Angaben kritisch, so findet man, daß in keinem Falle ein vollgültiger Beweis für die gezogenen Schlüsse vorliegt. Chassevant und Richet haben für die spontane Harnstoffbildung in der Leber die Harnsäure verantwortlich gemacht, ohne zu zeigen, daß diese in genügendem Maße präformiert gewesen war, und ohne noch andere in Betracht kommende stickstoffhaltige Stoffe auf Übergang in Harnstoff zu prüfen. (Salaskin, Zeitschr. f. phys. Chem. 25, 128, hat beim Durchströmen überlebender Säugetierleber einen Übergang von Glykokoll und Leucin in Harnstoff beobachtet; vgl. dazu auch O. Loewi: „Über das harnstoffbildende Ferment der Leber", Zeitschr. f. phys. Chem. 25, 511, welcher als Vorstufe der supponierten Harnstoffbildung Glykokoll und andere Aminosäuren feststellt, die Harnstoffbildung selbst aber leugnet, da die erhaltene stickstoffhaltige Substanz zwar in Alkoholäther löslich, aber kein Harnstoff [vielleicht eine Vorstufe desselben] sei.)

Ascoli und Subkow haben dieser spontanen Harnstoffbildung überhaupt keine Aufmerksamkeit geschenkt; bei Ascolis Versuch kann es sich überdies ebenso um Allantoin wie um Harnstoff gehandelt haben, da dieses beim Verfahren nach Pflüger-Schöndorff als Harnstoff mitbestimmt wird. Der Versuch von Wiener beweist nur das Auftreten geringer Mengen benzoylierbarer Zersetzungsprodukte, nicht aber die Bildung von Glykokoll, da weder dieses noch die eventuell vorhandene Hippursäure isoliert und analysiert wurde; bedenkt man jedoch, daß die Benzoylierung keine quantitative Methode ist, so gestattet jene geringe Differenz von 0,07 gebundener Benzoesäure zugunsten der Zersetzungsprobe (bei einer gesamten Menge der gebundenen Benzoesäure von über 0,2) überhaupt keine Beurteilung des Zersetzungsvorganges. Die Glykokollbildung aus Harnsäure ist somit weder für den lebenden Organismus (vgl. oben) noch für die Zersetzung durch überlebende

Organe nachgewiesen. Auch die Versuche Cipollinas scheinen mir bei den Schwierigkeiten, denen die Oxalsäurebestimmung in Organen begegnet, die Überführung von Harnsäure in Oxalsäure durch überlebende Organe nicht endgültig zu beweisen, zumal gerade bei der kräftig zersetzenden Leber eine nennenswerte Oxalsäurebildung nicht beobachtet werden konnte.

Die Frage nach den Produkten der Harnsäurefermentation durch tierische Organe ist demnach noch nicht gelöst.

Bei allen Versuchen, welche das Studium der Umwandlung von Stoffen durch überlebende Organe zum Zwecke haben, müssen die in den Organen neben den Eiweißkörpern präformierten an der Umsetzung unbeteiligten Stoffe (Extraktivstoffe) die Untersuchung wesentlich erschweren, da sie zum größten Teile in die Filtrate von den koagulierten Eiweißkörpern übergehen. Wie groß oft die Masse der Extraktstoffe der Organe sein kann, zeigten mir Versuche, auf die ich an anderem Orte noch zu sprechen kommen werde. Es war z. B. von einem entfetteten Rindernierenpulver noch ein volles Drittel seines Gewichtes in Alkohol löslich. Diese Extraktstoffe sind zum großen Teile wasserlöslich und dialysabel, sie lassen sich entfernen, ohne daß die Eiweißkörper und Fermente irgendwie verändert oder geschädigt werden müßten, und man erhält Organpräparate, deren Filtrate nach der Eiweißkoagulation fast völlig frei von Salzen, Farb- und Extraktstoffen sind. In derartigen Filtraten mußte die Isolierung der Zersetzungsprodukte der Harnsäure verhältnismäßig leicht gelingen.

Mit solchen möglichst gereinigten Präparaten von Rinderniere und Hundeleber habe ich nun in drei Versuchen die Zersetzungsprodukte der Harnsäure studiert. Die Zersetzung wurde in der Weise vorgenommen, daß eine Lösung von harnsaurem Natrium vier bis acht Stunden mit den gereinigten Organemulsionen bei 40° geschüttelt wurde; hierbei zeigte nun zwar ein Kontrollversuch, wie auch die Hauptversuche, daß aus diesen Organpräparaten selbst noch stickstoffhaltiges Material in Lösung ging, die Menge dieser Verunreinigungen war aber in den Versuchen absolut und insbesondere im Verhältnis zur Masse der zugesetzten Harnsäure so gering, daß sie die Bestimmung der Stickstoffverteilung in der Zersetzungsflüssigkeit und die Darstellung des Zersetzungsproduktes in keiner Weise störte [1]). Die zugesetzte Harnsäure

---

[1]) In Versuch I ging aus einer Emulsion, entsprechend 6 g trockener Rinderniere 0,016 g Stickstoff in die eiweißfreie Lösung, gegenüber dem Stickstoff der zersetzten Harnsäure = 0,21; in Versuch III ging aus einer Emulsion,

wurde in allen drei Versuchen restlos zerstört. Der Stickstoff der Zersetzungsflüssigkeit zeigte folgendes Verhalten: Die Zersetzungsflüssigkeit gab, bis auf einen Versuch, mit Phosphorwolframsäure so gut wie gar keine Fällung; nur in einem Versuche war diese erheblicher. Dieser Versuch war aber dadurch getrübt, daß die Eiweißkörper der Zersetzungsflüssigkeit mit angesäuertem Alkohol nicht ausfielen und ich dadurch genötigt war, die ganze Masse zur Verjagung des Alkohols stark einzuengen; bei dieser Prozedur dürften (wie auch der Vergleich des gesamten Stickstoffs mit dem der zugesetzten Harnsäure zeigte) aus den Eiweißkörpern stickstoffhaltige mit Phosphorwolframsäure fällbare Substanzen in Lösung gegangen sein (Albumosen?[1]). Ammoniak war nie in der Zersetzungsflüssigkeit nachweisbar. Die Hauptmasse des Stickstoffs war in einer durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Form vorhanden, und entsprach der Menge des Stickstoffs der zugesetzten Harnsäure: Versuch I, zuges. 0,21 g Harnsäurestickstoff, mit Phosphorwolframsäure nicht fällbar 0,19 g Stickstoff; Versuch II, zuges. 0,52 g Harnsäurestickstoff, mit Phosphorwolframsäure nicht fällbar 0,54 g; Versuch III, zuges. 0,44 g Harnsäurestickstoff, mit Phosphorwolframsäure nicht fällbar 0,41 g. — Weiter ließ sich der Stickstoff der mit diesem Reagens gefällten Zersetzungsflüssigkeit zum allergrößten Teile durch fünfstündiges Erhitzen mit Phosphorsäure auf 150° als Ammoniak gewinnen. — Von den eben mitgeteilten Werten ließen sich in Versuch I 92 Proz., in Versuch II 97,9 Proz., in Versuch III 95 Proz. Stickstoff in dieser Weise als Ammoniak abspalten.

Nach dem gegenwärtigen Stande unseres Wissens konnten also Aminosäuren unter den Zersetzungsprodukten der Harnsäure durch tierische Organe, wenn überhaupt, nur spurweise vorhanden sein. Nach dem Verhalten des Stickstoffs der Zersetzungsflüssigkeit gegen Phosphorwolframsäure und Erhitzung mit Phosphorsäure kam nur Harnstoff und Allantoin in Betracht. Daß etwa vorhan-

---

entsprechend 17 g trockener Hundeleber, 0,055 g Stickstoff in die eiweißfreie Lösung gegenüber dem Stickstoff der zersetzten Harnsäure = 0,44 g. Versuch II scheidet für diese Beurteilung aus gleich zu besprechenden Gründen aus.

[1]) Die eiweißfreien Filtrate der Ausgangsemulsionen vor der Zersetzung reagierten nicht mit Phosphorwolframsäure; da die Harnsäure nun stets vollständig zersetzt war, beziehe ich die auch in den beiden anderen Versuchen beobachteten, wenn auch sehr geringen, Fällungen mit Phosphorwolframsäure auf durch das Schütteln bei 40° in Lösung gegangene Stoffe; damit stimmt auch der Vergleich des durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Stickstoffs mit jenem der zugesetzten Harnsäure überein.

dener Harnstoff durch den Gang der Untersuchung nicht zerstört worden war, bewies die Abwesenheit von Ammoniak. — Harnstoff konnte nun in keinem Versuche isoliert werden, dagegen wurde in allen Versuchen Allantoin isoliert und durch Stickstoffanalyse sowie Schmelzpunktbestimmung sichergestellt (beim Einengen der enteiweißten Zersetzungsflüssigkeiten fiel es sogleich in farblosen Kristallen aus). Aus den auf weniger als 1 ccm eingeengten Mutterlaugen war mit Salpetersäure in der Kälte keine Fällung zu erzielen. Dagegen waren die tatsächlich kristallisiert isolierten Allantoinmengen so groß, daß sie in Anbetracht der unvermeidlichen Verluste beim Umkristallisieren den theoretisch geforderten Werten sehr nahe kommen. Versuch I, der nicht quantitativ durchgeführt war, scheidet aus. In Versuch II wurden isoliert 1,104 g Allantoin (nicht umkristallisiert), während sich aus der zersetzen Harnsäure 1,4578 g Allantoin berechnen. In Versuch III entsprach die zersetzte Harnsäuremenge 1,23 g Allantoin, das kristallisiert isolierte Allantoin wog 0,6206 g. In diesem Versuche war das gesamte im Vakuum zur Trockene eingeengte Zersetzungsmaterial mit absolutem Alkohol zur Entfernung etwa vorhandenen Harnstoffes extrahiert worden und nur der ungelöste Rückstand zur Allantoindarstellung verwendet worden. Durch den Alkohol wurde, wie sich zeigte, ein Teil des Allantoin gelöst und ging später verloren. Eine quantitative Bestimmung des Allantoins in einem Teile des ungelösten Rückstandes durch Fällung mit Merkurinitrat, Waschen, Zersetzen der Fällung mit H_2S und Verdampfen zur Trockene ergab außerdem den höheren Wert von 0,88 g Allantoin. In Anbetracht dessen dürfte sich auch in diesem Versuche das tatsächlich gebildete Allantoinquantum weit höher stellen und der von der Theorie geforderten Menge nähern. Im Zusammenhange damit spricht das Ergebnis der Stickstoffverteilungsversuche und die Unmöglichkeit, Harnstoff darzustellen, dafür, daß bei der befolgten Versuchsanordnung die Harnsäure durch überlebende Rinderniere und Hundeleber quantitativ zu Allantoin oxydiert wird. Jedenfalls liegt aber eine allfällige Bildung von Harnstoff oder Glykokoll kaum im Bereiche der Nachweisbarkeit. Ob bei lange dauerndem Schütteln oder bei anaerober Anordnung des Zersetzungversuches, wie bei Subkow (l. c.), andere Resultate erhalten werden, müssen weitere Versuche lehren. Das schließliche Auftreten von Harnstoff oder Glykokoll bei der Harnsäurefermentation durch tierische Organe ist durch meine Ergebnisse

natürlich nicht widerlegt, sie zeigen nur, daß die erste Stufe jener Oxydation zu Allantoin führt, analog der Harnsäureoxydation bei alkalischer Reaktion in vitro.

Wenn nun auch noch die Gültigkeit dieses fermentativen Vorganges für die vitale Harnsäurezersetzung zu erweisen bleibt, so ist doch durch die mitgeteilten Ergebnisse die Bedeutung des Allantoins für die vitale Harnsäurezersetzung wieder gestützt worden und der chemische, namentlich der oxydative Abbau des Allantoins in vitro, sowie das Schicksal des Allantoins im Organismus gewinnt höheres physiologisches Interesse.

Das Allantoin findet sich bekanntlich in der Allantoisflüssigkeit der Kühe, im Harne saugender Kälber und im Harne fleischgefütterter Hunde. Besonders reichlich findet sich Allantoin im Hundeharn nach Thymusfütterung [Cohn[1]), Minkowski[2])] und Pankreasfütterung (Salkowski[3]), nach Thymus- und Pankreasfütterung auch im Katzenharne (L. B. Mendel und E. W. Brown[4]). Ferner wurde Allantoinausscheidung beobachtet nach Fütterung von Nukleoproteïd (aus Weizen) bei Katzen und nach Injektion von Thymusextrakt in das Rektum bei Hunden (L. B. Mendel[5]); ebenso wie nach Zufuhr von Nukleïnsäure aus Weizenembryonen (L. B. Mendel, J. P. Underhill und B. White[6]), Thymusnukleïnsäure (Minkowski[2]) und Hypoxanthin (Minkowski[2]); Adenin, sowie die gesamten Spaltungsprodukte der Thymusnukleïnsäure, ja auch durch Kochen gewonnenes Thymusextrakt führen nach Minkowski[2]) zu keiner vermehrten Allantoinausscheidung beim Hunde. — Ob nach Harnsäurezufuhr Allantoin im Harne auftritt, ist, wie oben besprochen, noch kontrovers. Von Interesse ist die Bildung von Allantoin aus Glykolyldiharnstoff im Hundeorganismus (Eppinger[7]); ferner findet sich Allantoin reichlich im Harne nach Vergiftung mit Hydrazin [Borissow[8]), Poduschka[9]), Pohl[10])], Hydroxylamin, Semicarbazid und Amidoguanidin (Pohl[10]), und nach Zufuhr von Glyoxylsäure (Eppinger[11]), sodann fand Pohl[10])

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 25, 507 (1898).
[2]) Arch. f. experim. Path. u. Pharm. 41, 375 (1898).
[3]) Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1898, 929—931.
[4]) Am. Journ. of Phys. 3, 761—770, zitiert nach Jahrb. f. Tierchem. 30, 761.
[5]) Ebenda 6, XIV, zitiert nach Jahrb. f. Tierchem. 33.
[6]) Ebenda 8, 377—403, zitiert nach Jahrb. f. Tierchem. 33, 872.
[7]) Diese Beiträge 6, 287 (1905).
[8]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 19 (1894).
[9]) Arch. f. experim. Path. u. Pharm. 44, 59 (1900).
[10]) Ebenda 48, 367 (1902).
[11]) Diese Beiträge 6, 492 (1905).

Allantoin reichlich bei der Autolyse, insbesondere der Leber und Darmschleimhaut. Poduschka[1]) ermittelte, daß die Allantoinausscheidung der Hunde beim Hungern abnimmt.

Über das Schicksal des Allantoins im Tierkörper wurde folgendes mitgeteilt. Der Hund scheidet eingeführtes Allantoin quantitativ aus [Minkowski[2]), Poduschka[1]), Pohl[3])], der Mensch dagegen nicht [Minkowski[2]), Poduschka[1]). Luzzato[4])] beobachtete nach Allantoinzufuhr beim Hunde nur partielle Ausscheidung, beim Kaninchen das Auftreten vermehrter Oxalsäure, Schloss[5]) berichtet über das Auftreten von Glyoxylsäure im Harne nach Allantoindarreichung. Während es sonach festzustehen scheint, daß das Allantoin in größerem Umfange beim vitalen Abbaue der Nahrungsnukleoproteïde und Nukleïnsäuren, sowie der Körpernukleoproteïde durch Vergiftungen und Autolyse in vitro, eventuell aber auch synthetisch gebildet wird (ob das Allantoin aus dem Hundeharn bei exzessivem Hunger schwindet, ob es ein normales Stoffwechselprodukt ist, wäre noch zu ermitteln), sind die Beziehungen zur vitalen Harnsäurespaltung, sowie das Schicksal des Allantoins im Tierkörper noch nicht völlig aufgeklärt; hier werden weitere Versuche anzuknüpfen sein.

Auszug aus den Versuchsprotokollen.

Alle Stickstoffbestimmungen wurden nach Kjeldahl ausgeführt. Das verwendete Natriumurat war von Schuchardt (Görlitz) bezogen, sein Stickstoffgehalt wurde zu 25,99 und 25,85 Proz. gefunden.

Als Fermentmaterial dienten nicht die frischen Organe, sondern die daraus nach der oben gegebenen Vorschrift dargestellten trockenen Pulver.

Nachstehend sei der mit Hundeleberpulver ausgeführte Versuch (III) ausführlicher, I und II nur auszugsweise mitgeteilt.

Versuch III.

20 g Hundeleberpulver wurden am 14. III. 1906 mit 0,4 Proz. Natriumfluorid und 0,05 Proz. Soda in der Farbenmühle gemahlen; die Emulsion bis 16. III. gegen dieselbe Flüssigkeit dialysiert und durch Um-

---

[1]) Arch. f. experim. Path. u. Pharm. **44**, 59 (1900).
[2]) Ebenda **41**, 375 (1898).
[3]) Ebenda **48**, 367 (1902).
[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 38, 537—543.
[5]) Diese Beiträge **8**, 452 (1906).

fällen mit $^1/_2$ Volumen einer Lösung von Kaliumacetat in Wasser zu gleichen Teilen, zum Teil durch Waschen mit $^1/_3$ Volumen der genannten Lösung gereinigt, bis die Filtrate farbstoff- und eiweißfrei abliefen. Der Rückstand wurde hierauf mit 0,05 Proz. Soda und 0,08 Proz. Thymol gemahlen und gegen dieselbe Flüssigkeit vom 21. bis 25. III. dialysiert. Endvolumen der Emulsion 1000; 50 ccm = 1 g Ausgangsmaterial.

26. III. 1906. 50 ccm zersetzen von 0,14 g Harnsäure als Na-Salz 0,11 g.

27. III. 1906. 100 ccm zersetzen 0,14 g Harnsäure als Na-Salz restlos.

Am 28. III. wurden 850 ccm mit einer Lösung von 1,7 Natr. uric. in einer 3-Literflasche 8 Stunden bei 40° geschüttelt und hierauf sofort durch etwa 20 Tropfen Essigsäure glatt ausgefällt, filtriert und der Rückstand gewaschen.

Niederschlag I, mehrmals mit Wasser ausgekocht, enthält keine Harnsäure.

Filtrat I + Waschwasser wurde im Vakuum im Wasserstoffstrome bei weniger als 60° bis auf 450 ccm eingeengt. Es zeigte folgende Reaktionen: Mit Phosphorwolframsäure und HCl sehr geringfügige Fällung; mit ammoniakalischer Silberlösung und Magnesia mixtur kein Niederschlag (die Harnsäure war also vollständig zersetzt worden); mit Silbernitrat sehr geringe in Salpetersäure lösliche Fällung; mit Bleiessig sehr geringe Trübung; mit Mercurinitrat sehr mäßige flockige Fällung. 5 ccm mit Magnesiumoxyd im Vakuum destilliert, ergaben die Abwesenheit von Ammoniak. Je 5 ccm enthalten in zwei Versuchen 0,0055 g Stickstoff. 410 ccm Filtrat I wurden mit 5 ccm Phosphorwolframsäurelösung (Pfaundler) versetzt, es entstand kaum eine Trübung, erst auf weiteren Zusatz von 5 ccm HCl entstand eine geringe flockige Fällung. Volumen 420. Filtration auf der Nutsche. Das Filtrat wurde mit Bleioxyd in der Kälte neutralisiert und das Ungelöste abgenutscht.

Rückstand II. Nicht untersucht.

Filtrat II. Fällt nicht mit Bleiessig. Je 5 ccm enthalten in zwei Versuchen 0,0045 g Stickstoff. In den Rest von Filtrat II wurde H_2S eingeleitet, es erfolgte nur geringe Abscheidung von PbS. Der H_2S wurde durch Luft verdrängt und die Flüssigkeit abgenutscht: Filtrat III.

Filtrat III. Je 10 ccm wurden mit 10 ccm starker Phosphorsäure 5 Stunden auf 150° erhitzt, das gebildete Ammoniak entsprach in beiden Analysen 0,0082 g Stickstoff. 355 ccm Filtrat III wurden im Vakuum unter 60° bei Einleitung von Wasserstoff zur Trockene verdampft. Der Rückstand war rein weiß und kristallisiert, er wurde längere Zeit mit warmem absolutem Alkohol behandelt, die Lösung filtriert, der Rückstand nachgewaschen.

Filtrat IV (alkohollöslicher Teil der Zersetzungsprodukte). Filtrat und Waschalkohol wurden im Vakuum zur Trockene gebracht, der Rückstand löste sich langsam wieder völlig in absolutem Alkohol. Der Alkohol wurde nun zum zweiten Male im Vakuum abdestilliert. Der weiße Rückstand löste sich leicht in Wasser und gab folgende Reaktionen: mit $AgNO_3$ entstand eine geringfügige Fällung, im Filtrat von derselben dagegen mit verdünntem NH_3 ein reichlicher flockiger Niederschlag (Allantoin). Bei der weiteren Verarbeitung auf Allantoin und Harnstoff ging diese Fraktion ver-

loren. Daher kann über ein allfälliges Vorhandensein von Harnstoff in diesem Versuche nichts ausgesagt werden.

Rückstand IV (von Alkohol nicht gelöster Teil der Zersetzungsprodukte). Dieser Rückstand löst sich schwer in Wasser. Volumen 260. 50 ccm wurden unter Neutralisation der frei gewordenen Säure mit Mercurinitrat gefällt, die Fällung mit Wasser völlig ausgewaschen, durch H_2S zerlegt, dieser durch Luft verdrängt. Da sich das Quecksilbersulfid in kolloider Lösung befand und nicht abscheiden wollte, mußte ein wenig HCl zugesetzt werden. Das klare Filtrat samt Waschwasser wurde zur Trockene verdampft, der Rückstand, zur Gewichtskonstanz getrocknet, wog 0,1303 g. Der Rest der Lösung wurde zur Kristallisation eingeengt, die rein weiße Kristallisation gewaschen und getrocknet. Mutterlauge und Waschwasser wurden mit Mercurinitrat gefällt, die Fällung, wie oben gewaschen und zerlegt, ergab noch eine zweite tadellose Kristallisation. Beide Fraktionen wogen vereinigt 0,3859 g. Dieses Produkt wurde einmal aus Wasser umkristallisiert, nur mit wenig Wasser gewaschen und dann zunächst im Vakuum bei 37°, dann bei 100° zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Kristalle verbrannten rückstandslos und schmolzen in zwei Versuchen bei 232 und 233°; Allantoin schmilzt bei 230°.

0,1777 g enthielten 0,0628 g Stickstoff = 35,36 Proz. Stickstoff.
Allantoin ($C_4H_6N_4O_3$) enthält 35,44 Proz. Stickstoff.

Auf das Ausgangsvolumen berechnet, ergibt sich folgende Bilanz:

Stickstoff der zersetzten Harnsäure	0,4402 g
Stickstoff der Zersetzungsflüssigkeit nach Entfernung der Eiweißkörper	0,4948 g
davon mit Phosphorwolframsäure nicht fällbar	
a) im ganzen	0,4147 g
b) durch Phosphorsäure abspaltbar	0,3965 g
Ammoniak-Stickstoff	0,0000 g
Allantoin, berechnet aus der zersetztenHarnsäure	1,23 g
Allantoin, berechnet aus der Mercurinitratfällung des von Alkohol nicht gelösten Teiles der Zersetzungsprodukte	0,8803 g
Allantoin, berechnet aus den tatsächlich isolierten Kristallen	0,6206 g

Versuch I und II waren mit Rindernierenpulver (10 g bzw. 20 g) angestellt.

Die Stickstoffbestimmung in den Zersetzungsflüssigkeiten ergab nachstehende Stickstoffverteilung:

Versuch I.

Stickstoff der zugesetzten Harnsäure	0,2076 g
Gesamt-Stickstoff der Zersetzungslösung	0,1971 g
(wovon 0,0156 g aus der Organemulsion stammten)	
Ammoniak-Stickstoff	0,0000 g
Durch Phosphorwolframsäure nicht fällbarer Stickstoff (*a*)	0,1920 g
Mit Phosphorsäure als NH_3 abspaltbar	0,1767 g
(92 Proz. von *a*).	

Versuch II.

Stickstoff der zugesetzten Harnsäure	0,518 g
Gesamt-Stickstoff der Zersetzungsflüssigkeit nach Enteiweißung	0,7526 g
Davon mit Phosphorwolframsäure fällbar (*a*)	0,5393 g
Mit Phosphorsäure abspaltbar . . . . (97,9 Proz. von *a*)	0,5275 g
Allantoin aus der zugesetzten Harnsäure berechnet	1,4578 g

Aus dem Gewicht des tatsächlich isolierten Allantoins (0,5834 g) ergibt sich ein Gehalt der Zersetzungsflüssigkeit an Allantoin von 1,1041 g = 75,5 Proz. der Theorie.

Das in Versuch I erhaltene Allantoin schmolz bei 229° (unkorr.) unter Bräunung und enthielt 33,49 Proz. Stickstoff, das aus Versuch II dargestellte schmolz bei 230° (unkorr.) unter Bräunung und gab 35,30 Proz. Stickstoff. Allantoin ($C_4H_6N_4O_3$) schmilzt bei 230° und enthält 35,44 Proz. Stickstoff.

Abgeschlossen im Juli 1906.

☞ Diesem Hefte sind beigegeben: Ein Prospekt der Verlagsbuchhandlung von **Friedr. Vieweg & Sohn** in **Braunschweig**, betr. 1. ***Celsus***, Die Arzneiwissenschaft. — 2. ***Beckmann***, Die Rassen des Hundes. — 3. Meteorologische Zeitschrift. XXIV. Band.

Beiträge
zur
Chemischen Physiologie
und
Pathologie

Zeitschrift für die gesamte Biochemie

unter

Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben

von

Franz Hofmeister

o. Professor der physiologischen Chemie an der Universität Straßburg

IX. Band 8. bis 11. Heft

(Ausgegeben April 1907)

Braunschweig

Druck und Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn

1907

Inhalt des 8. bis 11. Heftes.

Die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie“ erscheinen in zwanglosen Heften, von denen 12 einen Band von etwa 30 Druckbogen zum Preise von M. 15,— bilden.

Die Ausgabe der Hefte erfolgt nach Maßgabe des einlaufenden Materials in kurzen Zwischenräumen. Die Zahl der in einem Jahre erscheinenden Bände soll zwei nicht überschreiten.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Straßburg i. E., Wimpfelingstraße 2, zu richten.

Bei der Aufnahme von Arbeiten in die „Beiträge“ soll in erster Reihe deren biologisches Interesse, sodann Exaktheit der Durchführung, Sachlichkeit, Knappheit und Übersichtlichkeit der Darstellung maßgebend sein. Polemische Ausführungen, welche den Rahmen einer tatsächlichen Richtigstellung überschreiten, können nicht Aufnahme finden. Der kurzen Mitteilung neuer Befunde bleibt ein besonderer Raum vorbehalten. Solchen „kürzeren Mitteilungen“ kann ein besonders rasches Erscheinen zugesichert werden.

Die Mitarbeiter erhalten ein Honorar von M. 40,— für den Druckbogen und 50 Sonder-Abzüge.

XXI.

Über die Aussalzbarkeit des Kaseïns und Parakaseïns durch Kochsalz*).

Von Sigval Schmidt-Nielsen.

Die Angaben der Literatur über das Verhalten von Kaseïnlösungen gegen Sättigung mit Kochsalz sind ziemlich widersprechend. Es kann dies darauf zurückgeführt werden, daß einzelne Untersucher mit reinem Chlornatrium gearbeitet haben, andere dagegen mit dem gewöhnlichen Kochsalz, das lösliche Kalksalze enthält. Wie nämlich Hammarsten[1]) schon in seinen grundlegenden Untersuchungen über die Labgerinnung (1873/74) berichtet, ist es für die Aussalzung des Kaseïns unbedingt notwendige Bedingung, ein kalkhaltiges Kochsalz zu verwenden. Hammarsten gibt an (a. a. O. S. 455), daß ein so gewonnenes Kaseïn nach Auflösen in Wasser nicht durch reines Chlornatrium gefällt wird, wohl aber vollständig nach Zusatz von Chlorcalcium. Durch spätere Untersuchungen konnte Sebelien[2]) feststellen, daß die Ausfällung des Kaseïns mit dem kalkhaltigen Kochsalz so vollständig ist, daß sich durch Gerbsäurefällung kein Stickstoff im Filtrate nachweisen läßt.

Da nun Raudnitz (1903) in seiner zusammenfassenden Darstellung: Die Bestandteile der Milch[3]) über die in dieser Frage vorliegenden Untersuchungen von Arthus, Béchamp, Hewlett, Sebelien, Söldner zu dem Schlusse kommt, daß es nicht sichergestellt scheint, ob Kochsalzsättigung bei Zimmertemperatur die Kaseïnsalze vollkommen ausfällt, und da keine näheren Angaben

*) Diese Untersuchungen sind zum großen Teil auch in der Olof Hammarsten gewidmeten Festschrift, Upsala 1906, mitgeteilt worden.

über die Bedingungen der von Hammarsten (später von Sebelien) beschriebenen vollständigen Aussalzung vorliegen, sah ich mich veranlaßt die Kochsalzaussalzung, besonders in bezug auf ihre Abhängigkeit von der Menge löslicher Kalksalze (und Erdalkalisalze überhaupt), zu untersuchen. Es lag mir dies um so näher, als ich nach einer Methode suchte, die es gestatten sollte, Kaseïn und Parakaseïn von ihren nächsten Spaltungsprodukten sicher zu trennen.

1. Versuche mit Kaseïn.

Zu diesen Versuchen habe ich nach der Hammarstenschen Methode dargestelltes Kaseïn verwendet, und zwar teils ein Präparat, das ich von der Firma Merck bezogen hatte, teils Präparate, die ich selbst dargestellt hatte.

Die letzteren waren nach den Vorschriften Hammarstens aus frischer Vollmilch dargestellt und durch 5 oder 6 maliges Auflösen in schwachem Alkali, Ausfällen durch Säure und wiederholtes Waschen mit Wasser und nach dem letzten Ausfällen mit Alkohol und Äther sorgfältig gereinigt. Aus dem lufttrockenen Kaseïn wurde die zu untersuchende Kaseïnlösung durch Auflösen einer gewogenen Menge Kaseïn und einer eben zur Neutralisation hinreichenden Menge $^1/_{10}$n-NaOH dargestellt.

Die Lösungen enthielten stets 2 g Kaseïn auf 100 ccm. Wenn diese 2 proz. Kaseïnlösungen mit chemisch reinem Chlornatrium gesättigt wurden, zeigte das Mercksche Kaseïn milchige Trübung, die sich allmählich zu einer kleinen Fällung sammelte. Bei dem von mir selbst dargestellten Kaseïn zeigte sich dagegen gar keine Opaleszenz oder Fällung; die Lösung war sofort und auch nach längerer Zeit völlig wasserklar. Da ich nun eine Reihe von verschiedenen Kaseïndarstellungen (10) gemacht und immer das gleiche Resultat erhalten habe, glaube ich den Schluß ziehen zu können, daß wirklich reine, neutrale Natriumkaseïnatlösungen von Chlornatrium gar nicht gefällt werden.

Auf der anderen Seite kann man sich leicht davon überzeugen, daß das reine Natriumkaseïnat in 2 proz. Lösungen durch Sättigung mit dem gewöhnlichen Kochsalz (mit ungefähr 0,4 Proz. Ca, wesentlich als Chlorid, und 0,05 Proz. Mg) so vollständig gefällt wird, daß im Filtrate keine Spur der Hellerschen Eiweißreaktion auftritt, und auch mit Essigsäure bei einem Gehalt von 0,1 oder 0,2 Proz. keine Spur von Opaleszenz oder Fällung zustande kommt. Mit diesen sehr scharfen Reaktionen läßt sich also kein Kaseïn nachweisen, man kann daher annehmen, daß die Aussalzung eine vollständige gewesen ist.

Es geht dies weiter auch daraus hervor, daß im Filtrate, wie ich mich durch Stickstoffbestimmungen mehrmals überzeugen konnte, selbst bei Verwendung von 50 ccm mit dem Kjeldahlschen Verfahren nicht mit Sicherheit Stickstoff nachzuweisen war, d. h. es wurde nie mehr als 0,1 ccm $^1/_{10}$ n-Schwefelsäure verbraucht, was innerhalb der Fehlergrenzen liegt.

Um die zu einer quantitativen Aussalzung erforderliche Menge an Chlorcalcium zu bestimmen, habe ich eine 2proz. neutrale Natriumkaseïnatlösung mit wechselnden Mengen dieses Salzes versetzt und danach mit einer zur völligen Sättigung hinreichenden Menge reinen Chlornatriums in einer Reibschale mehrmals sorgfältig verrieben, teils sofort und teils nach einigen Stunden. Das Filtrieren geschah immer sofort nach dem letzten Verreiben. Um im Filtrat die Anwesenheit von nicht ausgesalzenem Kaseïn nachzuweisen, wurde teils die Hellersche Probe (in den Versuchen mit „Heller“ bezeichnet) angestellt, teils das Filtrat mit einer salzgesättigten Essigsäure bis zu 0,1 oder 0,2 Proz. versetzt (in den Versuchen mit „Essigsäure“ bezeichnet). Die Proben wurden erst dann als negativ angesehen, wenn nach 24stündigem Stehen keine Fällung zu beobachten war. Wenn die schließliche Beobachtung früher geschah, ist die Grenze bei einem geringeren Calciumgehalte zu ziehen.

Tabelle I.

Natriumkaseïnat-Chlorcalciumversuch.

Versuchslösung			Durch Chlornatriumsättigung bewirkte Fällung	Im Filtrate wurde Kaseïn nachgewiesen durch		
2proz. neutrale Natriumkaseïnatlösung ccm	Normale Chlorcalciumlösung ccm	Wasser ccm		Essigsäure		Heller
				zu 0,1 Proz.	zu 0,2 Proz.	
9	0,1	0,9	+	+	+	+
9	0,15	0,85	+	+	+	+
9	0,20	0,80	+ (Von hier ab leicht filtrierbar u. klares Filtrat)	+	+	+
9	0,25	0,75	+	?	+	+
9	0,30	0,70	+	?	—	?
9	0,35	0,65	+	—	—	—

Wie aus den in Tabelle I zusammengestellten Versuchen mit Chlorcalcium zu ersehen ist, ist zur Aussalzung die Hinzufügung von 3 Vol.-Proz. einer molekularnormalen (11,1 Proz. $CaCl_2$ enthaltenden) Chlorcalciumlösung, d. h. ein Gehalt von 0,33 Proz. $CaCl_2$

(= 0,13 Proz. Ca) erforderlich. Diese Calciummenge würde, wenn man die (unrichtige!) Voraussetzung macht, daß alles Calcium durch das Kaseïn gebunden wird, einem Calciumgehalt des ausgesalzenen Kaseïnats von etwa 6,5 Proz. entsprechen. Indessen muß derselbe geringer sein, da Chlorcalcium in der Lösung bleibt. Die Fällung ist nämlich nur bei einem gewissen Überschuß an Ca-Ionen beständig. Wenn man die ausgesalzene Kaseïnkalkfällung von dem kaseïnfreien Filtrate abtrennt und mit gesättigter Chlornatriumlösung auswäscht, geht die Fällung bald in Lösung. Ich war infolgedessen nicht in der Lage, ihren Calciumgehalt direkt zu bestimmen.

Von Interesse ist, daß das für Lackmus neutral reagierende Calciumkaseïnat sich nicht direkt aussalzen läßt. Ich habe mehrmals diesen Versuch angestellt, indem ich aus reinem Kaseïn durch Zusatz von gesättigtem Kalkwasser eine etwa 2 proz. neutrale Lösung darstellte. Da hierzu für je 2 g Kaseïn (mit 1,8 g Trockensubstanz) 22,6 ccm Kalkwasser (mit 0,09 Proz. Ca) erforderlich waren, bekam ich ein Kaseïnat mit etwa 1,1 Proz. Calciumgehalt, d. h. das Dicalciumkaseïnat von Courant und von Söldner[4]).

Tabelle II.

Calciumkaseïnat-Chlorcalciumversuch.

Versuchslösung			Durch Chlornatriumsättigung bewirkte Fällung	Im Filtrate wurde Kaseïn nachgewiesen durch	
2 proz. neutrale Calciumkaseïnatlösung ccm	Normale Chlorcalciumlösung ccm	Wasser ccm		Essigsäure zu 0,2 Proz.	Heller
9	0,1	0,9	+ (Alle Proben leichtfiltrierbar)	+	+
9	0,15	0,85	+	+	+
9	0,20	0,80	+	+	+
9	0,25	0,75	+	?	?
9	0,30	0,70	+	—	—

Nach Zusatz von Chlorcalciumlösung konnte auch in der Dicalciumkaseïnatlösung eine Aussalzung erzielt werden, und bei einem gewissen Gehalte daran wurde sie vollständig, wie aus Tabelle II ersichtlich ist. Dieser Gehalt beträgt etwa 2,5 Vol.-Proz. einer molekularnormalen Chlorcalciumlösung, d. h. 0,28 Proz. $CaCl_2$ (= 0,1 Proz. Ca), oder auf das Kaseïn berechnet etwa 5 Proz., also zusammen etwa dieselbe Calciummenge wie in Versuch I.

Über die bei der Aussalzung stattfindende Verteilung der Calciumionen (also auch den Calciumgehalt des ausgesalzenen Kaseïnats) hoffe ich später berichten zu können.

Wie Lundberg[5]) als erster gezeigt hat (1875 bis 1876), kann bei der Ausfällung des Käses das Calcium durch andere Erdalkalimetalle ersetzt werden.

Durch qualitative Versuche konnte ich mich leicht davon überzeugen, daß beim Aussalzen des Kaseïns mit Chlornatrium

Tabelle III.

Natriumkaseïnat-Chlormagnesiumversuch.

Versuchslösung			Durch Chlornatriumsättigung bewirkte Fällung	Im Filtrate wurde Kaseïn nachgewiesen durch		
2 proz. neutrale Natriumkaseïnatlösung ccm	Normale Chlormagnesiumlösung ccm	Wasser ccm		Essigsäure zu 0,1 Proz.	Essigsäure zu 0,2 Proz.	Heller
9	0,1	0,9	—			
9	0,3	0,7	+			
9	0,6	0,4	+	+	+	+
9	0,7	0,3	+	+	+	+
9	0,8	0,2	+ } Von hier ab leicht filtrierbar u. klares Filtrat	+	+	+
9	0,9	0,1	+	?	+	+
9	1,0	0,0	+	—	—	?
9	1,1	0,0	+	—	—	—

Tabelle IV.

Natriumkaseïnat-Magnesiumsulfatversuch.

Versuchslösung			Durch Chlornatriumsättigung bewirkte Fällung	Im Filtrate wurde Kaseïn nachgewiesen durch		
2 proz. neutrale Natriumkaseïnatlösung ccm	Normale Magnesiumsulfatlösung ccm	Wasser ccm		Essigsäure zu 0,1 Proz.	Essigsäure zu 0,2 Proz.	Heller
9	0,1	0,9	—			
9	0,3	0,7	+ (wenig)			
9	0,6	0,4	+	+	+	+
9	0,8	0,2	+	+	+	+
9	0,9	0,1	+	?	?	?
9	1,0	0,0	+	—	—	—

Ähnliches der Fall war, weshalb ich in analoger Weise, wie sie oben für die Natriumkaseïnat-Chlorcalciumversuche beschrieben ist, auch quantitative Versuche angestellt habe, um zu ermitteln, ob sich die Magnesium- und Baryum-Ionen genau so verhalten wie die des Calciums.

Tabelle V.

Natriumkaseïnat-Chlorbaryumversuch.

Versuchslösung			Durch Chlornatrium-sättigung bewirkte Fällung	Im Filtrate wurde Kaseïn nachgewiesen durch		
2proz. neutrale Natrium-kaseïnat-lösung ccm	Normale Chlor-baryum-lösung ccm	Wasser ccm		Essigsäure zu 0,1 Proz.	Essigsäure zu 0,2 Proz.	Heller
9	0,1	0,9	—			
9	0,3	0,7	+			
9	0,5	0,5	+			
9	0,6	0,4	+ } Von hier ab leicht filtrierbar u. klares Filtrat	+	+	+
9	0,7	0,3	+	+	+	+
9	0,8	0,2	+	+	+	?
9	1,0	0,0	+	—	—	—

In Tabelle III bis V sind die Versuche mit den molekular-normalen Lösungen von Chlormagnesium, Magnesiumsulfat und Chlorbaryum zusammengestellt.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß auch bei einem gewissen Gehalt an Mg und Ba die Aussalzung eine vollständige ist, oder mit anderen Worten: die Calciumionen können durch Baryum- oder Magnesiumionen ersetzt werden. Diese Erdalkaliionen sind jedoch bei dieser Aussalzung nicht miteinander gleichwertig. Um denselben Effekt, d. h. eine quantitative Aussalzung zu erreichen, muß die Anzahl von hinzugefügten Ba- und Mg-Ionen etwa dreimal so groß sein als wie die der Ca-Ionen. Wie aus den beiden Magnesiumversuchen hervorgeht, können die Anionen der zu verwendenden Erdalkalien verschieden sein.

Die ganze Erscheinung ist voraussichtlich so zu erklären, daß die aussalzbaren Baryum- und Magnesiumkaseïnate eine größere Löslichkeit in der Chlornatriumlösung besitzen als die Kaseïnate des Calciums. Doch habe ich dies wegen der dabei gegebenen Schwierigkeiten noch nicht sicher feststellen können.

Daß auch beim Aussalzen von Calciumkaseïnat die erforderliche Ca-Menge der Lösung durch Ba- und Mg-Ionen ersetzt werden kann,

habe ich mehrmals durch besondere Versuche festgestellt, halte indessen deren Wiedergabe hier für überflüssig.

Aus dem hier für das Kaseïn Gefundenen folgt, daß man bei Aussalzung des Kaseïns mit dem gewöhnlichen Kochsalz (das sowohl Calcium als Magnesium, wesentlich als Chlorid, aber auch als Sulfat enthält) ein Zusammenwirken der Calcium- und Magnesiumionen erhalten wird.

2. Versuche mit Parakaseïn.

Es ist allgemein bekannt, daß das Parakaseïn sich vor dem Kaseïn durch eine größere Fällbarkeit durch Erdalkalisalze (insbesondere Chlorcalcium) auszeichnet. Wenn nun, wie oben gezeigt, die Aussalzung des Kaseïns durch Chlornatrium bei Anwesenheit einer bestimmten Menge von Erdalkalisalz eine vollständige wird, so war zu erwarten, daß Ähnliches auch für das Parakaseïn gelten würde. Aller Wahrscheinlichkeit nach hatte man auch zu erwarten, daß für das Parakaseïn, seiner leichteren Fällbarkeit entsprechend, eine geringere Anzahl an Erdalkali-Ionen erforderlich sein würde.

Zu meinen Versuchen hierüber habe ich neutrale 2 proz. Natriumparakaseïnatlösungen verwendet.

Das hierzu erforderliche Parakaseïn habe ich aus dem von mir selbst bereiteten reinen Kaseïn dargestellt, indem ich neutrale Natriumkaseïnatlösungen 10 Minuten bei Körpertemperatur mit ein wenig Lab digerierte, danach das Lab durch Erhitzen auf 90° zerstörte, das Parakaseïn mit Essigsäure ausfällte, in Alkali löste, durch wiederholte Ausfällung mit Säure und Auswaschen mit Wasser reinigte, dann zuletzt rasch mit Alkohol und Äther trocknete.

Das so gewonnene reine Parakaseïn wurde in 2 proz. Lösungen (als Natriumparakaseïnat) durch Sättigung mit reinem Chlornatrium überhaupt nicht gefällt. Bei Sättigung mit dem gewöhnlichen Kochsalz (enthaltend 0,4 Proz. Ca und 0,05 Proz. Mg) tritt dagegen eine vollständige Ausfällung ein, d. h. mit der Hellerschen Probe oder durch Zusatz von salzgesättigter Essigsäure bis zu einem Gehalt von 0,1 oder 0,2 Proz. tritt keine Spur einer Fällung auf, auch ließ sich in 50 ccm des Filtrates kein Stickstoff nach der Kjeldahlschen Methode nachweisen.

In der oben für das Kaseïn beschriebenen Weise habe ich nun auch die zur vollständigen Aussalzung des Parakaseïns erforderliche Calciummenge bestimmt. Da in diesen Versuchen die hinzuzufügende Erdalkalilösung in mehreren von den Proben hinreichend ist, um an sich eine Fällung hervorzurufen, bin ich so verfahren, daß die wie gewöhnlich abgemessene Parakaseïnlösung im voraus

mit ein wenig Chlornatrium in Substanz versetzt wurde, wodurch ich teilweise die Fällung vermeiden konnte.

Tabelle VI stellt einen Parakaseïn-Chlorcalciumversuch dar.

Tabelle VI.

Natriumparakaseïnat-Chlorcalciumversuch.

Versuchslösung			Durch Chlornatriumsättigung bewirkte Fällung	Im Filtrate wurde Kaseïn nachgewiesen durch		
2 proz. neutrale Natriumparakaseïnatlösung ccm	Normale Chlorcalciumlösung ccm	Wasser ccm		Essigsäure zu 0,1 Proz.	Essigsäure zu 0,2 Proz.	Heller
9	0,15	0,85	+	+	+	+
9	0,20	0,80	+ } Leicht filtrierbar, klares Filtrat	—	—	—
9	0,25	0,75	+	—	—	—

Man ersieht hieraus, daß für die etwa 2 proz. Parakaseïnlösung 2 Vol.-Proz. der normalen Chlorcalciumlösung, d. h. etwa 0,22 Proz. $CaCl_2$ (= 0,08 Proz. Ca) oder, für das Parakaseïn berechnet, etwa 4 Proz. Ca hinreichen, um eine vollständige Ausfällung zu bewirken. Dies ist, wie zu erwarten war, eine geringere Ca-Menge als beim Kaseïn notwendig ist.

Tabelle VII.

Calciumparakaseïnat-Chlorcalciumversuch.

Versuchslösung			Durch Chlornatriumsättigung bewirkte Fällung	Im Filtrate wurde Kaseïn nachgewiesen durch		
2 proz. neutrale Calciumparakaseïnatlösung ccm	Normale Chlorcalciumlösung ccm	Wasser ccm		Essigsäure zu 0,1 Proz.	Essigsäure zu 0,2 Proz.	Heller
9	0,10	0,9	+ } Leicht filtrierbar, klares Filtrat	+	+	+
9	0,15	0,85	+	—	—	?
9	0,20	0,80	+	—	—	—

Die durch Auflösen von Kaseïn in Kalkwasser bereiteten 2 proz. Calciumparakaseïnatlösungen (mit etwa 1,1 Proz. Ca, d. h. Dicalciumparakaseïnat, siehe oben S. 314) zeigten in Übereinstimmung mit dem für das Dicalciumkaseïnat Gefundenen keine Fällung bei Sättigung mit Chlornatrium. Bei Zusatz von Chlorcalcium

werden sie, wie aus Tabelle VII ersichtlich ist, vollständig ausgesalzen.

Hierzu ist 1,5 Vol.-Proz. der normalen Chlorcalciumlösung oder ein Gehalt von 0,16 Proz. $CaCl_2$ (= 0,06 Proz. Ca) erforderlich, was für das Parakaseïn berechnet, etwa 3 Proz. entspricht, d. h. auch nun ist dieselbe gesamte Ca-Menge (etwa 4 Proz. des Parakaseïngewichtes) benötigt, als wenn das Ca ausschließlich als Chlorcalcium hinzugefügt worden wäre.

Bei der Aussalzung der Parakaseïnlösungen kann das Calcium durch Magnesium oder Baryumsalze ersetzt werden. Einige typische Versuche hierüber sind in den folgenden Tabellen VIII bis X zusammengestellt.

Tabelle VIII.

Natriumparakaseïnat-Chlormagnesiumversuch.

Versuchslösung			Durch Chlornatriumsättigung bewirkte Fällung	Im Filtrate wurde Kaseïn nachgewiesen durch		
2 proz. neutrale Natriumparakaseïnatlösung ccm	Normale Chlormagnesiumlösung ccm	Wasser ccm		Essigsäure zu 0,1 Proz.	Essigsäure zu 0,2 Proz.	Heller
9	0,1	0,9	—			
9	0,3	0,7	+	+	+	+
9	0,4	0,6	+ (Leicht filtrierbar von hier ab, klares Filtrat)	+	+	+
9	0,5	0,5	+		+	?
9	0,6	0,4	+	—	—	—

Tabelle IX.

Natriumparakaseïnat-Magnesiumsulfatversuch.

Versuchslösung			Durch Chlornatriumsättigung bewirkte Fällung	Im Filtrate wurde Kaseïn nachgewiesen durch		
2 proz. neutrale Natriumparakaseïnatlösung ccm	Normale Magnesiumsulfatlösung ccm	Wasser ccm		Essigsäure zu 0,1 Proz.	Essigsäure zu 0,2 Proz.	Heller
9	0,1	0,9	—			
9	0,4	0,6	+		+	+
9	0,5	0,5	+		+	?
9	0,6	0,4	+	—	—	—

Tabelle X.

Natriumparakaseïnat-Chlorbaryumversuch.

Versuchslösung			Durch Chlornatriumsättigung bewirkte Fällung	Im Filtrate wurde Kaseïn nachgewiesen durch	
2proz. neutrale Natriumparakaseïnatlösung ccm	Normale Chlorbaryumlösung ccm	Wasser ccm		Essigsäure zu 0,2 Proz.	Heller
9	0,1	0,9	–		
9	0,2	0,8	+ (wenig)		
9	0,3	0,7	+	+	+
9	0,5	0,5	+	+	+
9	0,65	0,35	+	–	–

Das Resultat aus diesen Versuchen ist das nämliche, wie das für Kaseïn gefundene. Auch bei Verwendung von Magnesium- oder Baryumsalzen läßt sich das Parakaseïn vollständig aussalzen. Dabei sind jedoch die Mg- und Ba-Ionen nicht mit den Ca-Ionen gleichwertig. Die ersteren sind etwa in der dreifachen Menge erforderlich.

Zusammenfassung.

Wirklich reine, neutrale Natriumkaseïnatlösungen und Natriumparakaseïnatlösungen (2proz.) werden durch Sättigung mit reinem Chlornatrium überhaupt nicht gefällt. Dagegen werden sie von dem gewöhnlichen Kochsalz (mit etwa 0,4 Proz. Ca und 0,05 Proz. Mg) vollständig ausgesalzen, indem Erdalkalikaseïnat ausgefällt wird. Die Ausfällung wird erst dann vollständig, wenn ein Überschuß an Erdalkalisalz vorhanden ist. Die Menge desselben konnte bis jetzt nicht bestimmt werden. Im ganzen müssen für das Kaseïn etwa 6,5 Proz., für das Parakaseïn etwa 3 Proz. seines Gewichtes an Ca vorhanden sein.

Die Ca-Ionen können von Ba- und Mg-Ionen ersetzt werden. Doch muß deren Anzahl, um eine quantitative Aussalzung zu bewirken, etwa dreimal so groß sein als die der Ca-Ionen.

Literatur.

[1]) Hammarsten, Olof, Om det chemiska förloppet vid caseïnets coagulation med löpe. Upsala Läkareförenings Förhandlingar **9**, 363 (1873 bis 1874).

[2]) Sebelien, J., Studien über die analytische Bestimmungsweise der Eiweißkörper mit besonderer Rücksicht auf die Milch. Zeitschr. f. physiol. Chem. **13**, 135 (1889).

[3]) Raudnitz, R. W., Die Bestandteile der Milch, ihre Eigenschaften und Veränderungen. Ergebnisse der Physiologie **2**, 193 (1903).

[4]) Söldner, Über das Kaseïn der Kuhmilch. Malys Jahresbericht **29**, 205 (1895).

[5]) Lundberg, Smärre bidrag till kännedomen om kaseïnet. Upsala Läkareförenings Förhandlingar **11**, 343 (1875 bis 1876).

XXII.

Die Beziehung des Molkeneiweißes zur Labgerinnung (Parakaseïnbildung).

Von Sigval Schmidt-Nielsen.

Die alte Angabe (1873/74) von Hammarsten[1]), daß bei der Umwandlung des Kaseïns in Parakaseïn durch Labgerinnung ein neuer Eiweißkörper, das sogenannte Molkeneiweiß, auftritt, kann, trotz der von Duclaux[2]) und anderen Forschern erhobenen Einwände, nicht mehr bezweifelt werden.

Eine andere Frage aber ist, wie das Auftreten von Molkeneiweiß erklärt werden soll, ob es in unmittelbarem Zusammenhange mit der Parakaseïnbildung, d. h. der Umwandlung des Kaseïns, steht, oder ob es eine für diese Umwandlung völlig gleichgültige Begleiterscheinung ist.

Wenn man von der Voraussetzung ausgehen wollte, daß das Kaseïn bei der Einwirkung des Chymosins nicht in Parakaseïn und Molkeneiweiß zerlegt wird, so hätte man betreffs des Auftretens des Molkeneiweißes an zwei Möglichkeiten zu denken: 1. entweder ist das Molkeneiweiß eine dem Kaseïnmolekül anhaftende Verunreinigung, die nach dessen Umwandlung in Parakaseïn von diesem getrennt werden kann; 2. wird das Molkeneiweiß durch dem Chymosin als Verunreinigung anhaftende proteolytische Enzyme gebildet.

Seit dem Jahre 1903 habe ich mich im medizinisch-chemischen Institute der Universität Upsala (Direktor Prof. O. Hammarsten) mit dieser Frage beschäftigt. Nachdem ich bei verschiedenen Gelegenheiten Teile von diesen Untersuchungen veröffentlicht habe (s. unten), möchte ich, nachdem sich in der letzten Zeit mehrere Untersucher um diese Frage bemüht haben, meine Erfahrungen zusammenfassend veröffentlichen.

1. In verschiedener Weise dargestellte Kaseïnlösungen geben bei der Labung Molkeneiweiß binnen wenigen Minuten.

Zuerst habe ich den überzeugenden Versuch von Hammarsten (l. c., S. 477—478) wiederholt: Eine Portion von der neutralen 2proz. Natriumkaseïnatlösung [3]) (S. 45) wurde mit einer geringen Menge verdünnter, gekochter Lablösung versetzt, eine andere mit der gleichen Menge nativer Lablösung. Beide wurden 5 bis 10 Minuten bei 40° digeriert und dann, um das Enzym zu vernichten, auf 90° erhitzt. Nach dem Erkalten wurden beide Proben in der Reibschale unter sehr innigem Verreiben mit gewöhnlichem Kochsalz gesättigt. Nach dem Filtrieren ergab sich, daß sich in der ersten Probe durch Hinzufügen von salzgesättigter Essigsäure bis zu 0,1 oder 0,2 Proz. keine Spur einer Fällung bildete. Im Filtrate der zweiten, mit nativem Lab versetzten Probe zeigte sich dagegen eine reichliche Fällung. Da nun, wie ich neulich in diesen „Beiträgen“ mitgeteilt habe [4]), das Parakaseïn sich ebenso vollständig aussalzen läßt wie das Kaseïn, und da ferner der Versuch ebenso ausfiel, wenn ich statt mit einer Natriumkaseïnat- mit einer Calciumkaseïnatlösung arbeitete (d. h. eine sichtbare Koagulation vor dem Aussalzen eintrat), muß der durch Essigsäure in den salzgesättigten Filtraten fällbare Eiweißkörper neugebildet sein. Das völlig negative Resultat des Kontrollversuches und die Kürze der zur Bildung dieses Eiweißes erforderten Zeit von wenigen Minuten schließen aus, daß es eine Verunreinigung des verwendeten Labextraktes oder das Produkt einer Mikrobenwirkung darstellt.

Zu genau demselben Resultat, d. h. daß das Molkeneiweiß binnen weniger Minuten gebildet wird, sind auch P. Th. Müller [5]), später Petry [6]) und Spiro [7]) bei Versuchen am Hammarstenschen Kaseïn gekommen. Ich brauche deswegen nicht näher auszuführen, daß meine Versuche mit verschiedenen von mir selbst, sowie von anderen nach Hammarsten hergestellten Kaseïnpräparaten, die bis achtmal umgefällt worden waren, genau in gleicher Weise ausfielen.

Wenn das Molkeneiweiß nur eine dem Kaseïn anhaftende Verunreinigung darstellte, die bei der Parakaseïnbildung einfach in Lösung bliebe, so läge es nahe, daran zu denken, daß die Darstellungsweise des Kaseïns die Bildung dieser Verunreinigung bedingen könnte und daß es durch Änderung der Darstellungsmethode vielleicht möglich wäre, ein Kaseïn ohne molkeneiweißbildende Fähigkeit darzustellen. Namentlich war ja nicht ganz

unwahrscheinlich, daß die Säurefällung bzw. die Alkalibehandlung, selbst wenn ein Überschuß sorgfältig vermieden wurde, einen Einfluß in dieser Richtung ausüben könnte.

Ich habe daher auch reines Kaseïn durch die zweite zu seiner Darstellung verwendbare Methode, nämlich das Aussalzen mit kalkhaltigem Kochsalz, dargestellt. Nach sechs Fällungen und wiederholtem Auswaschen mit gesättigter Kochsalzlösung war es von kochsalzlöslichen Eiweißkörpern völlig frei.

Das Präparat, das also weder mit Säure oder Alkali, noch mit Alkoholäther behandelt worden war, wurde in Wasser gelöst und (unter Zusatz von Toluol) dialysiert. Die so gewonnene Kaseïnkalklösung gerann sofort mit einer kleinen Menge Lab und bildete dabei Molkeneiweiß, während eine gleichzeitig mit gekochtem Lab behandelte Kontrollprobe kein Molkeneiweiß enthielt.

Die Darstellungsweise des Kaseïns kann somit nicht für die durch Labbehandlung auftretende Molkeneiweißbildung maßgebend sein.

2. Nimmt die Menge des Molkenstickstoffs mit der Zeit der Einwirkung zu?

Wie schon oben angeführt, kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß das Molkeneiweiß nicht durch das Chymosin selbst gebildet wird, sondern seine Entstehung einem dem Chymosin beigemengten proteolytischen Enzym verdankt. In diesem Falle muß die Menge an Molkeneiweiß auch nach beendetem Labungsvorgang stetig zunehmen.

An anderem Orte [3]) habe ich über einige von mir in den Jahren 1903 und 1904 angestellte Versuche berichtet, wonach dies nicht der Fall sein sollte (a. a. O., S. 46). Ich sah nämlich, daß die Menge des in den salzgesättigten Filtraten mittels Essigsäurezusatz zu 0,1 oder 0,2 Proz. ausfällbaren Eiweißes nicht zunahm, wenn eine Natriumkaseïnatlösung statt der zur Parakaseïnbildung notwendigen 10 Min. etwa 6 Stunden bei 40° mit Lab behandelt wurde. Diese Versuche waren so ausgeführt worden, daß die Filtrate in abgemessenen Mengen in schmalen Probierröhrchen mit salzgesättigter Essigsäure versetzt und die Mengen der entstandenen Fällungen nach 24 Stunden nach der Höhe des Bodensatzes geschätzt wurden. Handelte es sich bei der Molkeneiweißbildung um einen stetig fortschreitenden Prozeß, so hätte man wohl, mit Rücksicht auf die relativ reichliche Menge, die sich innerhalb der ersten 10 Minuten bildet, erwarten sollen, daß nach der 35 fachen

Zeit (selbst unter Berücksichtigung der durch die gebildeten Produkte veranlaßten Hemmung) eine gewaltige Vermehrung der Fällung eintreten würde. Dies war jedoch nicht der Fall. Die Menge des gebildeten Molkeneiweiß erwies sich, nach dieser rohen Methode beurteilt, nicht als wesentlich vermehrt.

Ob nicht trotzdem eine Vermehrung stattfindet, mußte in anderer Weise untersucht werden. Am geeignetsten hierfür schien es, die Menge des gesamten in den Filtraten nach Kochsalzsättigung zurückgebliebenen Stickstoffs zu bestimmen, denn man kann nicht von vornherein die Möglichkeit ausschließen, daß sich neben dem durch Essigsäure fällbaren Molkeneiweiß auch ein anderes (z. B. ein durch Gerbsäure fällbares) findet, oder daß das Molkeneiweiß verdaut wird und sich so der Essigsäurefällung entzieht.

Ich habe deswegen die gesamte Menge des in den Filtraten nach Kochsalzsättigung zurückgebliebenen Stickstoffs nach der Kjeldahlschen Methode bestimmt, und zwar einmal sofort nach beendeter Parakaseïnbildung, sodann längere Zeit danach.

Als ein Teil dieser Untersuchungen, die zeigten, daß wirklich allmählich eine kleine Vermehrung des Molkenstickstoffs eintritt, schon im Drucke war [8]), erschienen Arbeiten von Petry [6]) und von Spiro [7]), die dasselbe Resultat brachten, nämlich daß die Einwirkung des Labs auf Kaseïnlösungen nicht mit der Parakaseïnbildung abgeschlossen ist. Petry (l. c.) konnte durch Aussalzungsversuche mit Magnesiumsulfat zeigen, daß die Eigenschaften des Parakaseïns sich allmählich verändern, die Fällbarkeit für Salze sich nach oben verschiebt und die charakteristische Fällbarkeit durch Kalksalze ganz verloren geht. Gleichzeitig bestimmte Petry die Menge des nach Sättigung mit Magnesiumsulfat im Filtrat zurückgebliebenen Stickstoffs und fand [6]) (S. 343) dieselbe ein wenig vermehrt (so z. B. von 0,049 Proz. nach 5 Minuten auf 0,063 Proz. Stickstoff nach 24 Stunden, oder von 0,08 Proz. nach 15 Minuten auf 0,119 Proz. Stickstoff nach 24 Stunden). Zu demselben Resultat gelangte unabhängig von ihm Spiro [7]) sowohl in bezug auf Molkenstickstoff, wie auf Parakaseïn, teilt aber keine Analysendaten mit.

Da Petry weder Kontrollversuche über den Stickstoffgehalt seiner zuweilen in überaus großer Menge verwendeten Lablösungen*),

*) Wenn Petry für Versuch 1 und 2 (l. c., S. 342—343) dieselbe Lablösung verwendet hat und man, wie ich es unten als berechtigt zeige, die Voraussetzung macht, daß die Menge des Molkenstickstoffs im Momente des

noch Analysen der Kaseïnlösungen mitteilt, läßt sich aus seinen Analysendaten nicht entnehmen, wieviel vom Kaseïnstickstoff nach verschiedener Zeit in Molkenstickstoff umgewandelt ist. Dies ist jedoch notwendig, wenn man sich eine richtige Vorstellung von den stattfindenden Prozessen bilden will.

Ehe ich meine Versuchsdaten mitteile, möchte ich kurz über die Versuchsanordnung berichten.

Das Kaseïn wurde in etwa 2 proz. neutralen Lösungen als Natriumkaseïnat verwendet; der Stickstoffgehalt derselben wurde für jeden Versuch nach Kjeldahl bestimmt. Zu jedem Versuche wurden gewöhnlich 90 ccm der Kaseïnlösung und 5 ccm Lablösung verwendet. Die Verdünnung der letzteren war durch Vorversuche (an Milch und Natriumkaseïnatlösung) so abgepaßt, daß 5 ccm die zwei- bis dreifache Menge der zur Parakaseïnbildung binnen 10 Minuten benötigten Chymosinmenge enthielten. Diese Lablösungen waren so stickstoffarm, daß sie nur 0,005 bis 0,016 Proz. Stickstoff enthielten. Zu jeder Probe, die mit nativem Lab behandelt worden war, gehörte eine Kontrollprobe der gleichen Kaseïnlösung, die mit derselben Menge gekochten Labs während der Versuchszeit unter genau denselben Bedingungen behandelt wurde. Nach der für jede Probe bestimmten Zeit wurde Hauptprobe und Kontrollprobe, um die Enzyme zu vernichten, im Laufe von ein bis zwei Minuten auf 90 bis 95° erhitzt, danach abgekühlt, mit 40 g von ein und demselben Kochsalz (mit 0,4 Proz. Ca und 0,05 Proz. Mg) sorgfältig verrieben und nach 12 Stunden filtriert. Die Stickstoffbestimmungen geschahen in 50 ccm der Filtrate und zwar genau in derselben Weise für Hauptprobe und Kontrollprobe. Durch die getroffene Versuchsanordnung sind alle Versuchsfehler, wenn nicht ganz eliminiert, so doch auf ein Minimum gebracht, und die Mengen des in verschiedenen Versuchen gefundenen Molkenstickstoffs durchaus miteinander vergleichbar.

Um aus der Menge des in den Filtraten (Molken!) gefundenen Molkenstickstoffs die entsprechende Menge an Kaseïnstickstoff zu finden, muß eine annähernde Berechnung eingeführt werden. Zwar ist der Stickstoffgehalt der verwendeten Kaseïnlösung bekannt, aber bei der Sättigung mit Kochsalz findet sowohl eine Ausfällung, als auch eine Volumvermehrung statt. Wenn 90 ccm Kaseïnlösung und 5 ccm Lablösung mit Kochsalz gesättigt werden, bekommt man ein Volumen von etwa 110 ccm, d. h. 50 ccm Filtrat würden 43,2 ccm Kaseïnlösung entsprechen. Wenn man die Wassermenge in 50 ccm Filtrat berechnet und davon absieht, daß Wasser für die Kolloidquellung in Anspruch genommen wird, so erhält man 44,5 ccm Kaseïnlösung. Die Menge der abfiltrierbaren Molken beträgt 85 ccm. Auf Grund dieser Daten halte ich mich für berechtigt, anzunehmen, daß die 50 ccm Filtrat wenigstens der Hälfte der verwendeten 90 ccm Kaseïnlösung entsprechen. Der bei dieser Berechnung gemachte Fehler kann kaum mehr als die Analysenfehler ausmachen. Die als Resultat der Untersuchung angeführten Prozente des Kaseïnstickstoffs sind überall als Maximalwerte anzusehen.

---

beendeten Labungsvorganges konstant ist, läßt sich für seine offenbar sehr unreine Lablösung ein Gehalt von 0,7 Proz. Stickstoff berechnen.

Versuch I [siehe [8]) S. 17 und 18]: Verwendet wurde eine von mir selbst dargestellte Natriumkaseïnatlösung mit 0,30 Proz. Stickstoff. Die Hauptprobe von 600 ccm wurde mit 15 ccm einer nativen Lablösung, die Kontrollprobe von 200 ccm mit 5 ccm gekochter Lablösung versetzt. Von der Hauptprobe wurden nach 15 Minuten und nach 6 Stunden Proben genommen und in der oben angegebenen Weise erhitzt, ausgesalzen usw. Es zeigte sich, daß die Kontrollmolke 0,0025 Proz.*) Stickstoff (von der Lablösung und den Reagenzien stammend) enthielt, die Labmolke nach 15 Minuten 0,0114 Proz. Stickstoff, nach 6 Stunden 0,0153 Proz. Stickstoff. Nach 15 Minuten waren also 0,089 Proz. Stickstoff, nach 6 Stunden 0,0128 Proz. Stickstoff abgespalten, d. h. nach 15 Minuten 3,3 Proz. und nach 360 Minuten 4,74 Proz. des Kaseïnstickstoffs, bzw. eine nachträgliche Vermehrung von 1,44 Proz.

Versuch II. Die zwei Hauptproben von je 90 ccm werden bei 40° mit 5 ccm Lablösung (einer 4 proz. Verdünnung des Labextraktes von Blauenfeld und Tvedte in Kopenhagen) 10 und 390 Minuten digeriert. Nach Abzug des Stickstoffs der mit derselben Menge gekochten Labs behandelten Kontrollmolken ergab die Labmolke nach 10 Minuten 0,092 Proz. Stickstoff und nach 390 Minuten 0,0142 Proz. Stickstoff. Da die verwendete Kaseïnlösung 0,232 Proz. Stickstoff enthielt, waren also nach 40 Minuten 4,41 Proz., nach 390 Minuten 6,79 Proz. des Kaseïnstickstoffs abgespalten.

Versuch III. Hierzu habe ich nicht ein von mir selbst dargestelltes Kaseïn verwendet, sondern ein Präparat, das von Herrn Professor Graf K. A. H. Mörner dargestellt und mir freundlichst überlassen war. Zu je 90 ccm der 0,25 Proz. Stickstoff enthaltenden Kaseïnlösung wurden 5 ccm der im vorigen Versuche verwendeten Lablösung (4 proz. Verdünnung des Blauenfeld und Tvedteschen Präparates) hinzugefügt. Nach Abzug der Stickstoffmenge der Kontrollmolken ergab sich, daß nach 10 Minuten 0,0087 Proz. Stickstoff = 3,87 Proz., nach 360 Minuten 0,0129 = 5,73 Proz. Stickstoff abgespalten waren.

Versuch IV. Lösung desselben Kaseïns wie im Versuche III, und zwar ebenfalls mit 0,25 Proz. Stickstoff. Zu jedem Versuche wurden 90 ccm Kaseïnlösung und 5 ccm Lablösung verwendet. Statt der käuflichen Labextrakte wurde eine von mir aus frischer Kalbsmagenschleimhaut dargestellte Lablösung verwendet; der Stickstoffgehalt derselben betrug 0,005 Proz., d. h. die auf jeden Versuch entfallende Stickstoffmenge entspricht nur 0,2 ccm $^1/_{10}$ n-Säure. Die mit gekochter Lablösung versetzten Kontrollproben blieben während der ganzen Versuchszeit (also bzw. 10 Minuten und 300 Minuten) mit der Hauptprobe bei 40° zusammen. Nach Abzug des Stickstoffgehaltes der Kontrollmolken ergibt sich der Stickstoffgehalt der Labmolken nach 10 Minuten zu 0,095 Proz., nach 300 Minuten zu 0,0134 Proz. Nach 10 Minuten waren mit anderen Worten 4,22 Proz. und nach 300 Minuten 5,96 Proz. des Kaseïnstickstoffs in Molkeneiweißstickstoff umgewandelt.

Versuch V a. 90 ccm einer 0,255 Proz. Stickstoff enthaltenden Kaseïnlösung aus von mir selbst dargestelltem Kaseïn wurden mit 5 ccm einer käuf-

*) D. h. hier wie später Gramm Stickstoff auf je 100 ccm.

lichen Lablösung in 4proz. Verdünnung versetzt und bei 40° digeriert. Nach Abzug des Stickstoffs der Kontrollmolken zeigte sich, daß nach 10 Minuten die Labmolke 0,0103 Proz. Stickstoff, nach 300 Minuten 0,0155 Proz. Stickstoff enthielt, d. h., daß nach 10 Minuten 4,49 Proz., nach 300 Minuten 6,75 Proz. des Kaseïnstickstoffs in Molkenstickstoff überführt worden waren.

Die in den voranstehenden Versuchen mitgeteilten Daten über die etwa sofort nach Ablauf der Parakaseïnbildung gefundene Menge an Molkeneiweißstickstoff und die nach längerer Einwirkung gebildete sind in der nachstehenden Tabelle zusammengestellt.

Versuch	Menge des Molkenstickstoffs in Prozenten des Kaseïnstickstoffs nach					Differenz
	10 Minuten	15 Minuten	300 Minuten	360 Minuten	390 Minuten	
I	—	(3,3)	—	(4,74)	—	1,44
II	4,41	—	—	—	6,79	2,38
III	3,87	—	—	5,73	—	1,86
IV	4,22	—	5,96	—	—	1,74
Va	4,49	—	6,75	—	—	2,26

Trotzdem zu diesen Versuchen verschiedene Kaseïnpräparate und verschiedene Lablösungen verwendet wurden, ist das Ergebnis sämtlicher Versuche das gleiche: 1. Im Verhältnis zu der 25 bis 39fachen Zeit der Einwirkung findet nach beendeter Parakaseïnbildung immer eine überaus geringe weitere Bildung von löslichem Stickstoff statt, man bekommt nicht einmal die Hälfte des in der einfachen Zeit gebildeten. 2. Obwohl die Lablösungen in ihrer Wirkung auf Milch sicher weit auseinander gehen, ist doch die sofort abgespaltene Stickstoffmenge sehr annähernd konstant*).

Hieraus ist der Schluß zu ziehen, daß es sich nicht um einen und denselben stetig fortschreitenden Prozeß handeln kann, und es erscheint ausgeschlossen, daß es sich bei dem durch die Labgerinnung zuerst gebildeten Molkeneiweiß um eine Wirkung eines beigemengten proteolytischen Enzyms handelt.

Vielleicht könnte man gegen meine Versuchsanordnung einwenden, daß, trotzdem durch Vorversuche ermittelt worden war,

*) Versuch I weicht allerdings mehr ab, aber ich konnte feststellen, daß hier der gefundene Wert zu klein ist, indem der Stickstoffgehalt der verwendeten Kaseïnlösung zuerst zu hoch gefunden wurde, wie sich bei späteren Analysen zeigte.

daß die gebrauchte Labmenge etwa die zwei- bis dreifache des Benötigten betrug, die Verhältnisse sich doch bei einer höheren Konzentration anders gestalten würden. Ich habe deswegen folgenden Versuch angestellt:

Versuch Vb. Von der im Versuch Va verwendeten Kaseïnlösung (mit 0,255 Proz. Stickstoff) wurden 90 ccm mit 5 ccm einer Lablösung in 16 proz. Verdünnung bei 40° behandelt, während für den gleichzeitig ausgeführten Versuch Va (oben!) eine 4 proz. Verdünnung unter sonst gleichen Bedingungen zur Verwendung kam. Es zeigte sich nach Abzug des Stickstoffs der Kontrollmolken, daß nach 10 Minuten die Labmolke 0,0097 Proz. Stickstoff enthielt, nach 300 Minuten 0,0176 Proz. Stickstoff, d. h. nach 10 Minuten waren 4,23 Proz., nach 300 Minuten 7,63 Proz. des Kaseïnstickstoffs in Molkenstickstoff übergeführt worden.

Aus diesen Zahlen im Vergleiche mit denen des Versuches Va ist es ersichtlich, daß die Menge des sofort abgespaltenen Molkeneiweißes trotz der vierfachen Enzymmenge dieselbe ist (richtiger um ein wenig kleiner ist als die Analysenfehler), während die später gebildete Menge sich vermehrt hat. Man erhält hieraus sofort den Eindruck, daß die Vermehrung des Molkeneiweißes nach Ablauf der Parakaseïnbildung von einem anderen Agens als dem parakaseïnbildenden veranlaßt wird.

Die Richtigkeit dieser Vermutung wird bewiesen durch nachstehende Versuche.

3. Die Wirkung der Lablösungen auf Parakaseïn.

Das zu diesen Untersuchungen zu verwendende Parakaseïn wurde so dargestellt, daß reinstes Kaseïn (verschiedene Präparate), mit Natronlauge zu etwa 2 proz. neutralen Lösungen gelöst, etwa 10 Minuten mit verdünnter Lablösung in einer zur Parakaseïnbildung ausreichenden Menge behandelt wurde; danach wurde auf 90 bis 95° erhitzt, mit 4 Volumen Wasser verdünnt und schließlich das Parakaseïn mit Essigsäure ausgefällt. Letzteres wurde sorgfältig verrieben, mit destilliertem Wasser wiederholt ausgewaschen und mit Alkohol und Äther rasch entwässert. Von den Trockenpräparaten wurden jedesmal etwa 2 proz. neutrale Natriumparakaseïnatlösungen mittels verdünnter Natronlauge bereitet.

Die Versuchsanordnung war in bezug auf Labkonzentration, Erhitzung, Aussalzung, Stickstoffbestimmungen, Berechnung der Analysen usw. sowohl für die Hauptprobe wie die gleichzeitig gemachte Kontrollprobe die nämliche wie oben (S. 326).

Versuch VI. Von der 0,259 Proz. Stickstoff enthaltenden Parakaseïnatlösung wurden 90 ccm mit 5 ccm der Lablösung (4 proz. Verdünnung des Blauenfeld und Tvedteschen Präparates) 10 bzw. 300 Minuten bei 40° digeriert. Nach Abzug des Kontrollprobenstickstoffs zeigte sich, daß nach 10 Minuten im Filtrat 0,0003 Proz. Stickstoff, nach 300 Minuten 0,0037 Proz.

Stickstoff zu finden war, d. h. nach 10 Minuten waren vom Parakaseïnstickstoff 0,13 Proz., nach 300 Minuten 1,59 Proz. Stickstoff abgespalten.

Versuch VII. Die Parakaseïnlösung enthielt 0,303 Proz. Stickstoff. Hiervon wurden je 90 ccm mit 5 ccm der von mir selbst dargestellten Lablösung (s. oben Versuch IV) 10 bzw. 300 Minuten digeriert. Nach Abzug des Stickstoffs der Kontrollproben enthielt das Filtrat der Hauptproben nach 10 Minuten 0,0010 Proz. Stickstoff, nach 300 Minuten 0,0039 Proz. Stickstoff. Es waren also nach 10 Minuten 0,36 Proz. des Parakaseïnstickstoffs in Molkenstickstoff überführt worden, nach 300 Minuten 1,43 Proz.

Man ersieht aus diesen beiden Versuchen, die mit denselben Lablösungen in genau derselben Menge wie Versuch III und IV ausgeführt sind: 1. daß eine Umwandlung des Parakaseïnstickstoffs in sicher meßbarer Menge erst nach längerer Zeit*) eintritt, 2. daß die Menge dieses sekundär gebildeten Molkenstickstoffs ziemlich genau der in den Kaseïnversuchen unter ähnlichen Versuchsbedingungen nachträglich stattfindenden Vermehrung entspricht.

Ich ziehe hieraus den Schluß, daß die durch längere Einwirkung der Lablösungen auf Kaseïn stattfindende Vermehrung des durch Kochsalz nicht aussalzbaren Stickstoffs nicht auf das Parakaseïn bildende Enzym, das Chymosin, zurückzuführen ist, sondern auf eine demselben anhaftende parakaseïnverdauende Protease.

Daß wirklich die sekundäre Vermehrung des Molkenstickstoffs auf eine Protease zurückzuführen ist, wird durch die Tatsache gestützt, daß die Parakaseïnbildung und die sekundäre Vermehrung des Molkenstickstoffs in bezug auf ihre Abhängigkeit von der Enzymkonzentration verschiedenen Gesetzen folgen.

Es gilt als unbestritten, daß die Wirkung des Chymosins seiner Konzentration direkt proportional ist. Dies ist, wie aus Versuch VIII hervorgeht, bei der Verdauung des Parakaseïns durch die Protease der Lablösungen durchaus nicht der Fall.

---

*) In den hier angeführten Versuchen mit Parakaseïn habe ich allerdings gefunden, daß auch binnen der ersten 10 Minuten der Einwirkung ein wenig von Parakaseïnstickstoff in Lösung geht. Diese Menge liegt jedoch im Bereiche der Fehlergrenzen. Andere hier nicht anzuführende Versuche, die speziell darauf gerichtet waren, zu entscheiden, ob in den ersten 10 Minuten eine sicher meßbare Stickstoffmenge in Lösung geht, zeigten, daß die Menge des Stickstoffs der Hauptprobe bald ein wenig größer, bald ein wenig kleiner als die der Kontrollprobe ausfiel (d. h. um 0,05 bis 0,1 ccm $^1/_{10}$ n-H_2SO_4), was übrigens zu erwarten war, denn bei der in diesen Versuchen verwendeten geringen Enzymkonzentration kann die Proteasewirkung in 10 Minuten nicht sicher meßbar sein.

Versuch VIII. Drei Proben von 90 ccm einer 0,259 Proz. Stickstoff enthaltenden Natriumparakaseïnatlösung wurden mit je 5 ccm Lablösung von 5, 20 und 80 Proz. Labextrakt 300 Minuten bei 40° behandelt. Nach Abzug des Kontrollmolkenstickstoffs (jeder einzelnen Probe) zeigte sich, daß in Probe 1 das Filtrat 0,0034 Proz. Stickstoff enthielt, das von Probe 2 0,0063 Proz. Stickstoff und das von Probe 3 0,0118 Proz. Stickstoff. Es war also in Molkenstickstoff übergeführt:

Bei Enzymkonzentration 1 . . . . 1,46 Proz. des Kaseïnstickstoffs
„ „ 4 . . . . 2,70 „ „ „
„ „ 16 . . . . 5,06 „ „ „

Die Verdauungswirkung des Parakaseïns durch die Protease zeigt also nicht die einfache Proportionalität zur Enzymkonzentration, sondern ziemlich genau zur Quadratwurzel daraus, d. h. sie folgt dem sogenannten Schütz-Borissowschen Gesetz.

Zusammenfassung.

Die von mir gemachten Beobachtungen über die Einwirkung der Lablösungen auf reine Kaseïnlösungen können kurz folgendermaßen zusammengefaßt werden:

Bei der Einwirkung von Lablösungen auf Kaseïn findet in nächster Beziehung zu der Umwandlung in Parakaseïn eine Bildung von Molkeneiweiß statt. Die Menge desselben beträgt (maximal) etwa 4 Proz. des Kaseïnstickstoffs und ist von der Menge des zur Parakaseïnbildung verwendeten Labs unabhängig. Dieses Molkeneiweiß kann dem Kaseïn nicht einfach beigemengt sein, da das Kaseïn bei verschiedener Darstellungsweise (Säurefällung oder Aussalzung) es in gleicher charakteristischer Weise liefert; es muß vielmehr als ein Spaltungsprodukt des Kaseïns (oder, falls das Kaseïn kein einheitlicher Eiweißkörper ist, des Kaseïngemenges) aufgefaßt werden.

Außer dem Chymosin (d. h. dem Parakaseïn und Molkeneiweiß bildenden Enzym) enthält die Kalbsmagenschleimhaut eine auch in den käuflichen Labextrakten zu findende Protease, die das Parakaseïn angreift und deswegen eine scheinbare Vermehrung des zuerst gebildeten Molkeneiweißes veranlaßt. Die Wirkung dieser „Parakaseïn“protease folgt der sogenannten Schütz-Borissowschen Regel.

Literatur.

[1]) Hammarsten, Olof, Om det chemiska förloppet vid caseïnets coagulation med löpe. Upsala Läkareförenings Förhandlingar 9, 363 (1873—1874).

[2]) Duclaux, Traité de Microbiologie. T. 2. Paris 1899.

[3]) Schmidt-Nielsen, Sigval, Enzymer og Enzymvirkninger. W. Billes Bokförlag, Stockholm 1905.

[4]) Derselbe, Über die Aussalzbarkeit des Kaseïns und Parakaseïns durch Kochsalz. Diese Beiträge 9, 311 (1907).

[5]) Müller, P. Th., Vergleichende Studien über die Gerinnung des Kaseïns durch Lab und Laktoserum. Arch. f. Hygiene 44, 126 (1903).

[6]) Petry, Eugen, Über die Einwirkung des Labferments auf Kaseïn. Diese Beiträge 8, 339 (1906).

[7]) Spiro, K., Beeinflussung und Natur des Labungsvorganges. Dritte Mitteilung. Diese Beiträge 8, 364 (1906).

[8]) Schmidt-Nielsen, Sigval, Zur Kenntnis des Kaseïns und der Labgerinnung. Upsala Läkareförenings Förhandlingar. N. F. 11. Suppl. als Festband für Olof Hammarsten, 1906.

XXIII.

Versuche über den Kraft- und Stoffwechsel und den zeitlichen Ablauf der Zersetzungen unter dem Einfluß verschiedener Ernährung beim Hund.

Von **W. Falta, F. Grote** und **R. Staehelin.**

Aus der Medizinischen Klinik in Basel (Direktor: Prof. Dr. W. His).

Die Untersuchungen der letzten Jahre haben mancherlei Verschiedenheiten im physiologischen Verhalten der einzelnen Eiweißkörper, der Mannigfaltigkeit ihrer chemischen Konstitution entsprechend, aufgedeckt. Dabei ist die Wirkung im Wärmehaushalt des Organismus und besonders die spezifisch-dynamische Wirkung der einzelnen Eiweißkörper bisher noch nicht berücksichtigt worden. Die vorliegenden Untersuchungen beschäftigen sich zum Teil mit dieser Frage. Ferner wurde die spezifisch-dynamische Wirkung und der physiologische Nutzeffekt durch tryptische Verdauung hydrolysierten Eiweißes untersucht und so von dieser Seite der in letzter Zeit viel umstrittenen Frage näher getreten, ob derartig verändertes Eiweiß als dem nativen Eiweiß gleichwertiges Material angesehen werden kann. Endlich wurden die Untersuchungen auch auf den Einfluß von Kohlehydraten auf die Eiweißzersetzung und im besonderen auf die Wärmewirkung des Eiweißes ausgedehnt. Gerade die letztere Frage ist bisher mit einer geeigneten Methode noch nicht untersucht worden, da einerseits die Pettenkofer-Voitsche Methode nur die Bestimmung der CO_2-Produktion gestattet, andererseits die Zuntzsche Methode die Aufstellung 24stündiger Bilanzen nicht zuläßt, einschlägige Untersuchungen mit dem Hoppe-Seylerschen Apparat aber nicht vorliegen. Durch Benutzung des Jaquetschen Apparates waren wir in der Lage, bei gleichzeitiger Berücksichtigung der CO_2-Produktion und der O_2-Aufnahme nicht nur für 24 Stunden, sondern für noch kleinere Zeit-

räume Bilanzen aufzustellen. Es haben sich so auch für den zeitlichen Ablauf der Zersetzungen neue Momente ergeben. Es sind folgende Versuche angestellt worden:

1. ein Versuch mit Pferdefleisch,
2. „ „ „ Kaseïn,
3. „ „ „ Glutenkaseïn [1]),
4. „ „ „ hydrolysiertem Kaseïn,
5. „ „ „ Pferdefleisch und Lävulose.

Wir möchten hier gleich bemerken, daß diese Versuche in größerem Maßstabe geplant waren. Leider sind wir durch äußere Umstände an der Durchführung unseres Planes gehindert worden. Wir sind uns dessen bewußt, daß unsere Versuche in dieser Form nur orientierenden Charakter haben; wir wollen uns daher auf die Wiedergabe des Zahlenmaterials beschränken und nur eine kurze Diskussion der Resultate beifügen.

1. Experimenteller Teil.

A. Versuchsanordnung.

An einem 24 kg schweren, weiblichen, sehr mageren, kurzhaarigen Hunde wurden unter dem Einfluß der verschiedenen Nahrung der respiratorische Stoffwechsel und die Stickstoffausscheidung untersucht und daraus die Wärmeproduktion mit Hilfe von Standardzahlen berechnet. Einzig im Versuch mit hydrolysiertem Kaseïn ging es nicht an, mit Standardzahlen zu rechnen, sondern es mußte eine genaue Bilanz des Sauerstoff-, Stickstoff- und Kohlenstoffumsatzes aufgestellt und die Verbrennungswärme von Nahrung, Harn und Kot direkt kalorimetrisch bestimmt werden (s. unten Versuch IV). Daneben wurde jedesmal auch die Wasserdampfabgabe, meistens auch die Ammoniak- und Phosphorsäureausscheidung bestimmt.

Um am Beginne jedes Versuches gleiche Verhältnisse herzustellen, erhielt der Hund an einem bestimmten Tage 7 Uhr morgens eine eiweißarme Kost, die die Erhaltungsdiät etwas überschritt, bestehend aus 100 g Pferdefleisch, 100 g Reis und 80 g Schmalz. Dann hungerte er 48 Stunden, und erst dann begann der Stoffwechselversuch, der drei Tage dauerte. Am ersten wurde die Hungerzer-

---

[1]) Wir haben Glutenkaseïn als Vergleichsobjekt gewählt, weil es uns im Hinblick auf die Untersuchungen Staehelins über vegetarische Diät (Zeitschr. f. Biol. 49) von besonderem Interesse schien, ein vegetabilisches Eiweiß auf seine spezifisch-dynamische Wirkung zu prüfen.

setzung (also des zweiten Hungertages) festgestellt, am nächsten, also 72 Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme, erhielt das Tier die zu untersuchende Nahrung, und am letzten hungerte es wieder. In der Zwischenzeit (d. h. also am 5. und 6. IV., 12. bis 14. IV., 20. IV. bis 20. V.) konnte der Hund nach Belieben fressen. Wir hofften, er würde die durch die drei Hungertage herbeigeführte Gewichtsabnahme dann wieder ausgleichen. Das war nun freilich nicht ganz der Fall, so daß der Ernährungszustand, wie sich aus den Körpergewichtszahlen bei den einzelnen Versuchen ergibt, beim Beginn jedes Versuchs nicht genau der gleiche war. Es zeigte sich in der Folge, daß dieser Umstand einen unerwarteten Einfluß auf die Wärmeproduktion hatte, indem die Hungerzersetzung nicht nur absolut, sondern auch auf das Körpergewicht berechnet, abnahm.

Nur beim letzten Versuch mußte eine andere Anordnung getroffen werden, da die Arbeit möglichst bald abgeschlossen werden sollte. Am Tage nach der Fütterung mit hydrolysiertem Kaseïn wurde die Hungerzersetzung nur 12 Stunden lang untersucht und dann sofort der Versuch mit Fleisch und Lävulose angeschlossen. Wir durften die Zwischenperiode so kurz nehmen, da wir in den früheren Versuchen gesehen hatten, daß bei eiweißreicher, keine Kohlehydrate enthaltender Nahrung 24 Stunden nach der Nahrungsaufnahme die Hungerzersetzung bereits wieder erreicht war, und in der Tat haben wir auch im Versuch IV nach dieser Zeit Nüchternwerte erhalten. Leider konnte an den Fleisch-Lävulose-versuch keine Hungerperiode mehr angeschlossen, sondern der Versuch mußte 24 Stunden nach der Fütterung abgebrochen werden.

Um die spezifisch-dynamische Wirkung beim Hunde in Erscheinung treten zu lassen, standen zwei Wege offen. Entweder konnte bei gewöhnlicher Temperatur überschüssige Nahrung gegeben werden, oder eine eben ausreichende Nahrung konnte im Zustande der physikalischen Wärmeregulation, d. h. bei erhöhter Umgebungstemperatur, zugeführt werden. Wir wählten die zweite Versuchsanordnung, weil die Aufnahme eines großen Nahrungsüberschusses nicht mit Sicherheit zu erwarten war. Die Temperatur im Respirationskasten wurde immer zwischen 28 und 30° gehalten. Die Regulierung gelang leicht durch Heizen eines Ofens in der Nähe und Vorschieben von Schirmen zwischen Ofen und Kasten. Höhere Temperaturen als 30° vertrug der Hund nicht gut, sondern streckte dann die Zunge heraus und atmete in beschleunigtem Tempo. Wir glaubten uns um so eher mit 28 bis 30° begnügen zu dürfen,

als Rubner[1]) angibt, bis 27,4° sei es „in höchstem Maße wahrscheinlich", daß die Grenze der chemischen Regulation erreicht sei.

Wir beabsichtigten, um die Wirkung der reinen Eiweißkörper genau zu vergleichen, sowohl Fleischeiweiß als auch die anderen Substanzen mit einer möglichst geringen Menge einer kalorienarmen Nahrung vermischt zu verfüttern. Das scheiterte daran, daß der Hund das Fleischeiweißpulver, das durch Extraktion von Fleisch mit Wasser, Alkohol und Äther gewonnen war, nicht fressen wollte. Deshalb gaben wir im ersten Versuch mageres Pferdefleisch und ersetzten es in den folgenden durch eine Mischung der Eiweißkörper mit einer kleinen Menge Fleisch, Fleischextrakt und Schmalz, so daß ungefähr die gleichen Quantitäten von Eiweißstickstoff, Extraktstickstoff und Fett zugeführt wurden. Infolge eines Fehlers in der Berechnung sind geringe Differenzen vorhanden, so daß wir erhalten:

Im Versuch I: 688 g Pferdefleisch, die 3,20 Proz. N und 3,2 Proz. Fett enthielten = 22,02 g N und 22 g Fett. Vom N des Fleisches sind nach Rubner[2]) 12,21 Proz. in Extraktivstoffen enthalten, also sind von den 22,02 g N 2,89 g als Extraktivstoffe, 19,13 g als Eiweiß anzunehmen.

Im Versuch II:

120,0 g Kaseïn	=	17,43 g Eiweiß-N,		
140,0 g Fleisch . . .	=	3,93 g „ „	0,55 g Extraktiv-N,	4,5 g Fett
23,0 g Fleischextrakt	=	—	1,86 g „ „	—
17,5 g Schmalz . . .	=	—	—	17,5 g „
	Total	21,36 g Eiweiß-N,	2,41 g Extraktiv-N,	22,0 g Fett

Wir haben also im Kaseïnversuch etwas mehr Eiweiß und etwas weniger Extraktivstoffe gegeben, als mit dem Pferdefleisch. Auch in der Verbrennungswärme ist ein Unterschied vorhanden. Das Pferdefleisch lieferte bei der kalorimetrischen Bestimmung 1,5 Cal pro 1 g frischer Substanz, also 688 g = 1032 Cal, die Mischung von Fleisch, Schmalz und Extrakt lieferte 475 Cal, 120 g Kaseïn = 672 Cal, total 1129 Cal.

Der Hund befand sich während der ganzen Versuchsdauer im Kasten, mit Ausnahme der Zeit, die zum Füttern, Katheterisieren usw. nötig war. Zu diesem Zweck wurde er täglich morgens 7 Uhr aus dem Kasten genommen und sofort katheterisiert. (Die Falksche Operation war schon mehrere Monate früher vorgenommmen worden.) Dann verweilte er in einem Raum, in dem er umhergehen und den Kot absetzen konnte. Nun erfolgte die Wägung, dann erhielt das Tier zu saufen und ev. zu fressen.

---

[1]) Rubner, Gesetze des Energieverbrauchs bei der Ernährung, S. 330. Leipzig 1902.

[2]) Rubner, Arch. f. Hygiene 51, 29 (1904).

Um 8 Uhr wurde es wieder in den Respirationsapparat gebracht. Abends 7 Uhr wurde es nochmals zum Katheterisieren herausgenommen und eine halbe Stunde später wieder in den Kasten gesetzt.

Die Kotabgrenzung erfolgte jeweils am Morgen des ersten Versuchstages und am Schluß der dreitägigen Periode durch Eingießen einer Aufschwemmung von 1 bis 2 g Karmin.

Zu bemerken ist noch, daß der Hund im Respirationsapparat nie Kot absetzte und nie Urin ließ. Ganz besonders möchten wir betonen, daß er sich immer vollkommen ruhig verhielt. Nachdem er durch einige Vorversuche an den Apparat gewöhnt war, legte er sich jedesmal sofort nach dem Hineinbringen hin und bewegte sich nicht mehr. Ganz selten kehrte er sich auf die andere Seite und wenn man das Tuch vom Fenster des Apparates entfernte, schaute er bisweilen hin und wedelte mit dem Schwanze. Die Bewegungen konnten genau kontrolliert werden, da sie immer an den Blechwänden ein vernehmliches Geräusch verursachten.

B. Methodik.

Die Bestimmung der Kohlensäureproduktion und des Sauerstoffverbrauchs geschah in dem etwas modifizierten Jaquetschen Respirationsapparat, dessen Prinzip bekanntlich[1]) darin beruht, daß von der durch die Respirationskammer gesogenen Luft eine Durchschnittsprobe genommen und darin der Kohlensäure- und Sauerstoffgehalt nach Peterssen und Högland bestimmt wird.

Die genaue Beschreibung der einzelnen Modifikationen brauchen wir hier nicht wiederzugeben, da sie von Staehelin in den Verhandlungen der naturforschenden Gesellschaft in Basel, Bd. 19, veröffentlicht werden soll. Hier seien nur die wichtigsten Punkte erwähnt.

Zur Aufnahme des Hundes diente ein Kasten von 80 cm Länge, 45 cm Breite und 50 cm Höhe, dessen Boden eine geneigte Rinne bildete und in ein Rohr auslief, so daß der etwa im Kasten gelassene Urin durch den Rost, auf dem das Tier saß, abfließen und leicht aufgefangen werden konnte; der Hund wurde von oben in den Kasten gebracht. Der luftdichte Abschluß wurde dadurch erzielt, daß am oberen Rande des Kastens eine mit Paraffinöl gefüllte Rinne angebracht war, in die der Deckel hineinpaßte.

In das ganze System wurden zwei Wasserabsorptionsapparate eingeschaltet, der erste, um die von außen eingeführte Luft vor ihrem Eintritt in den Respirationskasten zu trocknen, der zweite, um aus der Luft nach dem Passieren des Kastens das Wasser zum Zweck der Wägung zu gewinnen. Jeder Apparat bestand aus zwei Kondensationsgefäßen, die in einer Kältemischung standen, und aus einer Chlorcalciumvorlage. Bei den ersten Vorversuchen hatten wir nur ein Kondensationsgefäß, ein schlangenförmig gewundenes Metallrohr mit einem Wassersack, angewandt, aber bei den 7 Stunden dauernden Versuchsperioden verstopfte sich das Rohr durch Eis, so daß der Widerstand zu groß wurde. Deshalb schalteten wir vor dem

[1]) A. Jaquet, Ein neuer Apparat zur Untersuchung des respiratorischen Stoffwechsels des Menschen. Verhandl. der naturforschenden Gesellschaft zu Basel 15, 252.

Schlangengefäß noch eine Glasflasche mit zwei Hälsen ein, durch deren einen das zuführende Glasrohr bis fast zum Boden reichte. In dieser Flasche wurde dann die größere Menge des Wassers niedergeschlagen, so daß keine Verstopfung mehr eintrat.

Die Kontrollversuche mit Verbrennung analysierter Kerzen ergaben sehr befriedigende Resultate. Die Fehler betrugen: + 2,5 Proz., — 1,2 Proz., — 1,1 Proz., + 1,6 Proz., — 0,54 Proz., + 0,10 Proz., Mittel — 0,4 Proz.

Wir dachten an die Möglichkeit, daß das kondensierte Wasser Kohlensäure absorbieren und einen Fehler in der Kohlensäurebestimmung verursachen könnte. An sich war das sehr unwahrscheinlich, da das Wasser ja in den Kondensationsgefäßen gefriert. Der Vorsicht halber haben wir jedoch am dritten Tage des dritten Versuchs die Frage in der Weise geprüft, daß wir die Kondensationsgefäße und das Chlorcalciumrohr am Schluß des Versuches im Zusammenhang herausnahmen und sofort verschlossen. Nach dem Auftauen des Kondensationswassers wurde ein Luftstrom, der durch Natronkalk von Kohlensäure befreit war, in der Weise durch das ganze System gesogen, daß er zuerst das Chlorcalciumrohr, dann die Kondensationsgefäße und schließlich zwei Barytwasservorlagen passierte. In diesen konnten nach 20 stündigem Durchleiten durch Titration höchstens 4 mg Kohlensäure nachgewiesen werden.

Um durch den eben beschriebenen Wasserabsorptionsapparat keine zu großen Widerstände zu verursachen, wurden alle Rohrverbindungen möglichst weit genommen. Es gelang auch tatsächlich, die Widerstände so klein zu gestalten, daß der Unterdruck in der Gasuhr, also am Ende des ganzen Systems, nie mehr als 3 cm Wasser betrug. Die Ventilation wurde so reguliert, daß nie Kondensation des Wassers im Tierkäfig eintrat. Der CO_2-Gehalt der Luft betrug dabei 0,5 bis 0,8 Proz.

Da bei dieser Anordnung trockene Luft durch die Gasuhr strömt, durfte sie natürlich nicht mit Wasser gefüllt sein. Wir wandten daher Paraffinöl als Sperrflüssigkeit an. Die Reduktion der durchgesogenen Luftmenge geschah durch Berechnung auf Grund der halbstündlich vorgenommenen Ablesungen des Gasuhrstandes, der Temperatur in der Gasuhr (Mittel von Zustrom und Abstrom), des Barometerstandes und des Unterdruckes in der Gasuhr. Vorversuche hatten häufigere Ablesungen unnötig erscheinen lassen, da die Temperatur im Versuchszimmer und die Ventilation sehr gleichmäßig waren. Auch stündliche Ablesungen hätten genügt, und bei der Berechnung konnte man häufig längere Perioden zusammennehmen, weil alle Ablesungen, mit Ausnahme der Gasuhr, unveränderte Resultate ergeben hatten.

Da die größten Differenzen im respiratorischen Stoffwechsel in den Stunden nach der Fütterung zu erwarten waren, haben wir den Tag in mehrere kürzere Perioden geteilt und die Respiration von 8 bis 11, 11 bis 3, 3 bis 7 Uhr gesondert untersucht, in der Nacht von $7\frac{1}{2}$ Uhr abends bis 1 Uhr und 1 bis 7 Uhr morgens. Der Jaquetsche Apparat war nun aber für kürzere Perioden berechnet, und das Sammelgefäß für die Probeentnahmen füllte sich schon nach 2000 Liter Luftdurchgang, also nach 1 bis 2 Stunden.

Durch eine flaschenzugartige Vorrichtung konnte aber leicht eine langsamere Abwickelung der Schnur, an der die Quecksilberausflußspitze hing, erreicht werden. Ein kleines Flüssigkeitsventil (mit Paraffinöl) verhinderte die Mischung der Luft im Sammelgefäß mit der Luft der Gasuhr.

Die Kontrollversuche mit Kerzenverbrennung ergaben, nachdem wir die genügende Übung erreicht hatten, eine befriedigende Genauigkeit des Apparates:

	CO_2 in Gramm			O_2 in Gramm		
	berechnet	gefunden	Fehler	berechnet	gefunden	Fehler
24. III.	232,8	228,9	— 1,67 Proz.	245,5	248,9	— 1,47 Proz.
25. VI.	230,37	226,26	— 1,78 „	242,90	238,20	— 1,93 „

Die Stickstoffbestimmungen wurden nach Kjeldahl, die Phosphorsäurebestimmungen im Harn durch Titrieren mit Urannitrat (Cochenille als Indikator) vorgenommen.

Kohlenstoff und Wasserstoff wurden in den Nahrungsmitteln und in der Trockensubstanz von Harn und Kot durch Elementaranalyse bestimmt, die Verbrennungswärme in dem Hempelschen Autoklaven[1]) festgestellt.

Der Kot wurde unter Zusatz der gleichen Gewichtsmenge einer 5proz. Oxalsäurelösung auf dem Wasserbade getrocknet, der Harn wurde auf dem Wasserbade auf etwa den dritten Teil des Volums eingeengt, dann im Vakuumexsikkator bei Zimmertemperatur vollständig getrocknet. Der Block wurde, obschon es leicht gelang, durch rasches Arbeiten beim Pressen Wasseraufnahme zu verhüten, doch vor dem Wägen nochmals in den Vakuumexsikkator gestellt. Auf diese Weise wurden die beim Eintrocknen des Harns so gefürchteten Verluste vermieden, wie folgender Versuch beweist:

Der Harn einer Versuchsperiode ergab bei der gewöhnlichen Verbrennung:

1. 1,439 Proz. 2. 1,457 Proz. Mittel 1,448 Proz. N.

25 ccm desselben Harns wurden auf dem Wasserbade bis fast zur Sirupkonsistenz eingeengt, dann 24 Stunden im Vakuumexsikkator getrocknet und wieder in Wasser gelöst. Die N-Bestimmung ergab in den dem ursprünglichen Urin entsprechenden Mengen:

1. 1,437 Proz. N. 2. 1,434 Proz. N. Mittel 1,435 Proz. N.

Der Verlust beträgt also 0,013 g N pro 100 ccm = 0,9 Proz.
Dieser Verlust kommt für die Kalorienberechnung gar nicht in Betracht.

Der Urin wurde immer in 12stündigen Perioden gewonnen, die Bestimmung der Kohlensäureproduktion, der Sauerstoffverbrauch

---

[1]) Hempel, Gasanalytische Methoden, 3. Aufl., S. 375. Braunschweig 1900. Vgl. auch Schlossmann, Zeitschr. f. physiolog. Chem. 37, 324.

und die Wasserdampfabgabe erlitten dagegen täglich zwei Unterbrechungen. Der Hund wurde morgens eine ganze, abends eine halbe Stunde lang aus dem Apparat herausgenommen, und nachdem er wieder in den Kasten gebracht war, wurde sofort die Ventilation in Gang gesetzt, aber erst nach einer halben Stunde mit der Entnahme der Luftproben begonnen[1]). Wir haben deshalb für eine $1^1/_2$ stündige Periode am Morgen und für eine 1 stündige am Abend die CO_2- und O_2-Werte zu interpolieren. Wir können dabei annehmen, daß am Morgen von 7 bis $7^1/_2$ Uhr, also vor der Fütterung, die gleichen Werte wie in der vorhergehenden Periode gültig seien, von $7^1/_2$ bis $8^1/_2$ Uhr dagegen das Mittel zwischen der vorhergehenden und der nachfolgenden Periode. Für die Abendpause ist das Mittel zwischen den beiden benachbarten Zeitabschnitten einzusetzen. Unter dieser Voraussetzung haben wir die Zahlen berechnet und in die Tabellen aufgenommen.

Etwas anders verhält sich die Wasserbestimmung. Die Absorption des Wassers begann sofort mit dem Beginn der Ventilation, das gewogene Wasser entspricht daher in jeder, einer Pause folgenden Periode einem Zeitraum, der eine halbe Stunde länger dauert, als bei der CO_2- und O_2-Bestimmung. Freilich vernachlässigen wir dabei die Tatsache, daß am Ende die Luft des Kastens immer nahezu mit Wasser gesättigt war, beim Beginn aber nicht. Da der Kasten aber keine 200 Liter hält und ein Teil davon noch durch den Hund eingenommen wurde, kann der Fehler nicht groß sein. Die Interpolation der Wasserwerte wurde unter der Voraussetzung vorgenommen, daß sie von morgens 7 bis $7^1/_2$ Uhr keine Veränderung gegenüber der Nacht gezeigt hätten, von $7^1/_2$ bis 8 Uhr und abends von 7 bis $7^1/_2$ Uhr aber die Mitte zwischen der vorhergehenden und der nachfolgenden Periode gehalten hätten.

Die unterschiedliche Berechnung der verschiedenen Werte haben wir in den Tabellen dadurch zum Ausdruck gebracht, daß wir immer hinter der Zeit, zu der der Hund in den Kasten gebracht wurde, noch den Beginn des Absaugens der Luftprobe in Klammern gesetzt haben. Auf die eingeklammerten Zeiten beziehen sich also die Zahlen für CO_2-Produktion und O_2-Konsum, auf die anderen die Wasserwerte.

---

[1]) Vorversuche bei Hungerzersetzung hatten uns gezeigt, daß nach einer halben Stunde der prozentische Gehalt der Ventilationsluft an CO_2 und O_2 konstant ist.

C. Versuche.

Versuch I (siehe Tabellen S. 342 bis 344).

Bemerkungen. 1. Da der Hund jedesmal 12 Stunden im Kasten verblieb, so konnte die N-Ausscheidung im Harn während des Respirationsversuches nur in 12stündigen Perioden bestimmt werden; die am Fütterungstage (Tabelle II) in Klammern befindlichen N-Werte entstammen einem Parallelversuch an einem anderen, ebenfalls sehr mageren Hunde (Lotti) von gleichem Körpergewicht und gleicher Körperhöhe. In diesem Versuch wurde der Harn in Perioden, welche unseren Respirationsperioden entsprachen, mit dem Katheter entnommen. Berechnet man aus den so gewonnenen Zahlen die N-Ausscheidung für je 12 Stunden, so stimmen diese Zahlen mit den im Respirationsversuch gewonnenen gut überein. Wir können daher jene interpolieren.

2. Die Zufuhr betrug 688 g Pferdefleisch. N-Gehalt = 3,20 Proz. = 22,016 g; Fettgehalt = 3,2 Proz. = 22 g. Cal pro 1 g frischer Substanz = 1,50.

3. Kot vom 2. IV., 7 Uhr morgens bis inkl. 5. IV., 7 Uhr morgens: feucht = 123,9 g, trocken = 35 g, N = 3,49 g, C = 15,108 g, Cal = 134. In der Trockensubstanz H = 2,981 g.

Berechnung der Beteiligung von Eiweiß, Fett und Kohlehydrat an der Zersetzung.

Eine genaue Berechnung des Anteiles der drei Haupttypen der Nahrungsmittel an der Zersetzung setzt die Kenntnis der N-C-H- und O-Bilanzen, die Bestimmung der O-Bilanz wiederum Aschenanalysen voraus. Letztere konnten wir wegen Mangels an Zeit nur für den Versuch mit hydrolysiertem Kaseïn durchführen. Für die Berechnung der anderen Versuche sind wir daher auf die von Zuntz[1]) angegebene Berechnungsweise angewiesen. Diese fußt auf den Arbeiten von Frentzel und Schreuer[2]) und von Koehler[3]). Diese Autoren haben die oben erwähnten Bilanzen bei Fleischfütterung aufgestellt. Zuntz hat daraus berechnet, wieviel Sauerstoff zur völligen Oxydation des in der Atemluft erscheinenden Eiweiß-Kohlenstoffs und -Wasserstoffs nötig ist. Durch die Berechnungsweise von Zuntz können allerdings nur Näherungswerte erreicht werden, da, wie unter anderen Magnus-Levy[4]) hervorhebt, die elementare Zusammensetzung der einzelnen eiweißhaltigen Gewebe und Eiweißkörper selbst wechselt und dem-

---

[1]) N. Zuntz, Höhenklima und Bergwanderungen in ihrer Wirkung auf den Menschen, S. 103. Berlin 1906.

[2]) Frentzel und Schreuer, Arch. f. Physiol. u. Anatomie. 4 Abhandlungen, 1901 bis 1903.

[3]) Koehler, Zeitschr. f. physiolog. Chem. 31, 479.

[4]) Magnus-Levy, v. Noordens Handbuch der Pathologie des Stoffwechsels. II. Aufl., 1, 205. Berlin 1906.

Versuch I. Erster Tag.

2. bis 3. April 1906.

Periode	Nahrung	Respiration: C [CO_2] in der Atemluft		O_2-Aufnahme		R. Q.	Ventilation	H_2O durch Lungen u. Haut		Harn: Harnmenge	Spez. Gew.	N		C	H	NH_3	P_2O_5	C/N	Körpergewicht
		in toto	stdl.	in toto	stdl.			in toto	stdl.			in toto	stdl.						
7—8h [8h 30]	250 Wasser	4,506 [16,52]	[11,012]	17,26	11,51	—	—	15,7	15,7										24,02
8h [8h 30] —11h		7,510 [27,53]	[11,012]	28,76	11,51	0,694	3244,3	57,2	15,7	193	1013	2,594	0,216	2,545	0,620	0,298	0,531	0,981	
11—3h		13,015 [47,75]	[11,938]	47,29	11,823	0,730	5251,4	58,2	14,55										
3—7h		14,18 [51,98]	[12,996]	49,161	12,29	0,765	5056,0	77,1	19,3										
7—7h 30 [8h]	80 Wasser	3,223 [12,09]	[12,09]	11,53	11,53	—	—	9,72	19,45										23,85
7h 30 [8h] —1h		15,248 [55,91]	[11,181]	53,906	10,781	0,748	6283,6	93,2	16,9	98	1035	2,676	0,223	2,279	0,754	0,275	0,603	0,852	
1—7h		19,957 [73,163]	[12,194]	70,008	11,668	0,756	7475,4	117,1	19,5										23,57
Total 7—7h	330 Wasser	77,639	—	277,915	—	—	—	428,2	—	291	—	5,270	—	4,824	1,374	0,573	1,134	—	Mittel 23,8

	aus Eiweiß	Fett	Kohlehydrat	Total
[C] Kalorien	[13,48] 131,6	[58,15] 715,2	[6,06] 57,2	[illegible]

Versuch I. Zweiter Tag.

3. bis 4. April 1906.

Periode	Nahrung	Respiration: C [CO_2] in der Atemluft in toto	C [CO_2] in der Atemluft stdl.	O_2-Aufnahme in toto	O_2-Aufnahme stdl.	R.Q.	Ventilation	H_2O durch Lungen u. Haut in toto	H_2O durch Lungen u. Haut stdl.	Harn: Harnmenge	Spez. Gew.	N in toto	N stdl.	C	H	NH_3	P_2O_5	C/N	Körpergewicht
7—8^h [8^{h}30]	688 g Pferdefleisch 290 Wasser	6,027 [22,097]	[14,732]	20,893	13,928	—	—	19,97	19,97			[3,39]	0,85						23,57
8^h [8^{h}30] —11^h		13,505 [49,509]	[19,80]	46,131	18,45	0,776	3210,2	64,3	21,4	340	1037 [N = 13,076]			8,056	2,283	0,543	1,275	0,616	
11—3^h		21,341 [78,237]	[18,78]	72,843	17,48	0,777	4946,2	122,6	30,65			[4,55]	1,14						
3—7^h		16,548 [60,667]	[15,82]	59,638	15,58	0,736	4794,2	125,6	31,4			[5,13]	1,28						
7—7^{h}30 [8^h]	425 Wasser	3,757 [13,774]	[13,774]	13,548	13,548	—	—	12,4	24,8			[2,52]	0,42						23,70
7^{h}30 [8^h] —1^h		15,997 [58,644]	[11,729]	57,787	11,517	0,736	6244,3	100,0	18,2	1,74	1029 [N = 4,896]			3,428	0,986	0,187	0,551	0,700	
1—7^h		18,858 [69,133]	[11,52]	70,736	11,79	0,706	7439,5	113,6	18,8			[2,376]	0,39						23,60
Total 7—7^h	688 g Pferdefleisch 715 Wasser	96,033	—	341,576	—	—	—	558,5	—	514	—	17,972	—	11,484	3,269	0,730	1,826	—	Mittel 23,6

[C] Kalorien	aus Eiweiß	Fett	Kohlehydrat	Total
7—7^h . . .	[33,47] 340,0	[23,20] 285,6	[0,74] 7,0	632,6
7—7^h . . .	[12,61] 138,9	[24,85] 305,4	[1,16] 11,0	455,3
Summa . .	[46,08] 478,9	[48,05] 591,0	[1,9] 18,0	1087,9

Versuch I. Dritter Tag.

4. bis 5. April 1906.

Periode	Nahrung	Respiration: $C[CO_2]$ in der Atemluft		Respiration: O_2-Aufnahme		R. Q.	Ventilation	H_2O durch Lungen u. Haut		Harn: Harnmenge	Spez. Gew.	N		C	H	NH_3	P_2O_5	C/N	Körpergewicht
		in toto	stdl.	in toto	stdl.			in toto	stdl.			in toto	stdl.						
7—8h [8h30]	190 Wasser	—	—	—	—	—	—	15,1	15,1										23,60
8h [8h30] —11h		—	—	—	—	—	—	34,1	11,4	105	1029	2,425	0,202	2,107	0,570	0,195	0,546	0,869	
11—3h		12,876 [47,203]	[11,80]	46,608	11,65	0,732	4590,1	62,2	15,55										
3—7h	300 Wasser	13,183 [48,329]	[12,082]	47,894	11,973	0,730	4526,6	62,5	15,6										
7—7h30 [8h]		3,254 [11,928]	[11,928]	11,691	11,691	—	—	8,29	16,58										23,50
7h30 [8h] —1h		16,06 [58,877]	[11,775]	57,045	11,409	0,746	5782,1	96,6	17,56	132	1023	2,310	0,192	2,205	0,526	0,178	0,653	0,955	
1—7h		32,37 [130,66]	—	116,50	—	—	—	93,8	15,65										23,42
Total 7—7h	490 Wasser	77,68	—	279,94	—	—	—	372,6	—	237	—	4,735	—	4,312	1,096	0,373	1,099	—	Mittel 23,5

	aus Eiweiß	Fett	Kohlehydrat	Total
[C] Kalorien	[12,12] 118,4	[59,06] 726,4	[5,5] 52,2	897,0

entsprechend bei gleichem N-Gehalt der Nahrung die Zusammensetzung der Abfallstoffe im Harn und Kot wechseln kann. Wir bewegen uns hier noch auf einer unsicheren Grundlage. Diese Berechnungsweise führt, wie sich später ergeben wird, in unseren Versuchen mit Eiweißnahrung (Versuch I bis III) zu sehr wahrscheinlichen, untereinander gut übereinstimmenden Resultaten, so daß wir in diesen Versuchen bei Anwendung derselben keine wesentlichen Fehler begehen dürften. Ob dies allerdings in vollem Maße Geltung hat in Versuchen, bei denen größere Mengen von Kohlehydraten am Stoffwechsel teilnehmen, soll später erörtert werden.

Zuntz berechnet für die Verbrennung von fettfreier Fleischtrockensubstanz pro g N eine O_2-Aufnahme von 5,91 Liter = 8,45 g O_2 und eine CO_2-Ausscheidung durch die Lungen von 4,75 Liter = 9,39 g CO_2 = 2,56 g C. Auf 1 g N im Harn kommen daher 2,56 g C in der Atemluft. Die Berechnung des ersten Versuches (erster Tag) gestaltet sich dann folgendermaßen: Im Harn erschienen 5,270 g N. Diesen entsprachen in der Exspirationsluft 5,270 × 2,56 = 13,472 g C und 5,270 × 8,45 = 44,467 g O_2.

In der Exspirationsluft wurden ausgeschieden 77,639 g C
davon Eiweißkohlenstoff . . . . 13,472 g C
Es bleiben für Fett und Kohlehydrate 64,167 g C

Wie sich dieser C auf Fett und Kohlehydrate verteilt, läßt sich mit Hilfe des O_2-Verbrauches berechnen.

Der O_2-Verbrauch beträgt . . . . 277,915 g
davon fällt auf Eiweiß . . . . 44,467 g
Es bleiben für Fett und Kohlehydrate 233,448 g O_2

1 g Fettkohlenstoff braucht zur Oxydation . . . . 3,751 g O_2[1])
1 g Kohlehydratkohlenstoff braucht zur Oxydation . . 2,651 g O_2

Setzen wir Fettkohlenstoff = x, Kohlehydratkohlenstoff = y, so ergeben sich folgende Gleichungen:

$$x + y = 64{,}167$$
$$3{,}751\,x + 2{,}651\,y = 233{,}448$$
$$y = 6{,}02 \text{ (C aus Kohlehydrat)}$$
$$x = 64{,}167 - 6{,}02 = 58{,}147 \text{ (C aus Fett)}.$$

Berechnung der Wärmeproduktion.

Da wir jetzt den Anteil von Fett, Kohlehydrat und Eiweiß an der Zersetzung kennen, können wir die Wärmeproduktion mit Hilfe der Rubnerschen[2]) Zahlen berechnen.

[1]) Magnus-Levy, a. a. O., S. 205.
[2]) M. Rubner, Gesetze des Energieverbrauches, a. a. O., S. 19, und Zeitschr. f. Biol. 21, 363.

Nach Rubner entspricht 1 g N im Harn bei Einschmelzung von Körpereiweiß = 25 Cal, bei Fleischfütterung = 26 Cal; 1 g C in der Exspirationsluft aus Fett = 12,3, aus Kohlehydraten = 9,5 Cal.

Daraus ergibt sich:

Im Harn wurden ausgeschieden:

5,270 g N;	5,270 × 25	= 131,6 Cal	aus Eiweiß
In der Exspirationsluft stammen:			
58,147 g C aus Fett;	58,147 × 12,3	= 715,2 „	„ Fett
6,02 g C aus Kohlehydraten;	6,02 × 9,5	= 57,2 „	„ Kohlehydraten
	Total Kalorienproduktion	= 904,0 Cal.	

Die Berechnung der übrigen Versuche wurde in gleicher Weise durchgeführt.

Versuch II (siehe Tabellen S. 347 bis 349).

Bemerkungen: 1. In diesem Versuch ging am zweiten Tage in der ersten 12stündigen Periode der Harn verloren. Der interpolierte Wert wurde in der Weise berechnet, daß wir als 24stündige N-Ausscheidung im Harn den Mittelwert aus den im Versuch I und III erhaltenen Werten annahmen, und hiervon die in der zweiten 12stündigen Periode erhaltene Zahl subtrahierten. Dieser Wert dürfte um etwa 1 g zu hoch sein, da der C, der bei dieser Berechnung auf Fettverbrennung fällt, um 3 g mehr O_2 zu seiner Oxydation nötig hätte, als nach Abzug des Eiweiß-O_2 übrig bleibt. Die so berechnete Wärmeproduktion ist also um weniges zu gering; doch können die Differenzen nicht groß sein.

2. Das im Futter gereichte Kaseïn (puriss. Hammarsten) enthielt 14,53 Proz. N.

3. Kot der ganzen Versuchsperiode feucht = 62 g, trocken = 20 g, N = 1,08 g, C = 8,744 g, Cal = 98,6 g, H in der Trockensubstanz = 1,256 g.

Versuch III (siehe Tabellen S. 350 bis 352).

Bemerkungen: 1. Am dritten Versuchstage wurde in der Periode 3 bis 7 Uhr das Respirationswasser in den Kühlvorrichtungen auf seinen CO_2-Gehalt untersucht (siehe Methodik, S. 338). Es fehlen daher die Wasserbestimmungen.

2. Das Glutenkaseïn (Ritthausen) stammte von Merck.

3. Kot der ganzen Versuchsperiode feucht = 67 g, trocken = 19 g, N = 1,55 g, C = 10,22 g, Cal = 121, H in der Trockensubstanz = 1,344 g.

Versuch IV (siehe Tabellen S. 353 bis 355).

Bemerkungen: Am 24. V., morgens, erhielt das Tier 140 g Pferdefleisch, 23 g Fleischextrakt, 17,5 g Schweinefett, dann wurden ihm 120 g durch Pankreatin verdautes Kaseïn, das in Wasser teils gelöst, teils aufgeschwemmt war, mit der Sonde eingegossen. Um über die Verhältnisse bei Fütterung mit hydrolysiertem Eiweiß vor Ausführung des Respirationsversuchs etwas ins klare zu kommen, hatten wir schon früher einen Vorversuch an dem-

Versuch II. Erster Tag.

9. bis 10. April 1906.

Periode	Nahrung	Respiration: $C [CO_2]$ in der Atemluft		O_2-Aufnahme		R. Q.	Ventilation	H_2O durch Lungen u. Haut		Harn: Harnmenge	Spez. Gew.	N		C	H	NH_3	P_2O_5	C/N	Körpergewicht
		in toto	stdl.	in toto	stdl.			in toto	stdl.			in toto	stdl.						
7—8h [9h]	125 Wasser	6,188 [22,685]	[11,342]	23,207	11,604	—	—	15,8	15,8										23,75
8h [9h] —11h		6,188 [22,685]	[11,342]	23,207	11,604	0,707	2798,4	47,5	15,8	190	1011	1,867	0,156	1,438	0,372	—	0,587	0,770	
11—3h		12,204 [44,74]	[11,18]	44,587	11,147	0,708	5519,3	46,7	11,68										
3—7h		13,432 [49,241]	[12,31]	48,667	12,167	0,738	5534,4	78,3	19,6										
7—7h30 [8h]	265 Wasser	3,167 [11,618]	[11,618]	11,642	11,642	—	—	8,81	17,62										23,5
7h30 [8h] —1h		14,901 [54,629]	[10,926]	55,583	11,117	0,711	6425,5	86,0	15,64	174	1018	2,027	0,169	1,757	0,475	—	0,505	0,867	
1—7h		19,27 [70,643]	[11,774]	70,498	11,416	0,725	7145,8	93,2	15,53										23,35
Total 7—7h	390 Wasser	75,350	—	277,39	—	—	—	376,3	—	364	—	3,894	—	3,195	0,847	—	1,092	—	Mittel 23,55

	aus Eiweiß	Fett	Kohlehydrat	Total
[C] Kalorien	[9,97] 97,3	[64,70] 795,8	[0,68] 6,5	899,6

Versuch II. Zweiter Tag.

10. bis 11. April 1906.

Periode	Nahrung	Respiration								Harn									Körpergewicht
		C [CO_2] in der Atemluft		O_2-Aufnahme		R. Q.	Ventilation	H_2O durch Lungen u. Haut		Harnmenge	Spez. Gew.	N		C	H	NH_3	P_2O_5	C/N	
		in toto	stdl.	in toto	stdl.			in toto	stdl.			in toto	stdl.						
7—8h [8h 30]	140 g Pferdefl. 120 g Kaseïn 23 g Fleischextr. 500 Wasser 17,5 g Schweinefett	5,814 [21,314]	[14,21]	20,296	13,530	—	—	17,99	17,99										23,35
8h [8h 30] —11h		13,011 [47,699]	[19,080]	44,411	17,76	0,777	3015,6	76,1	25,4	?	?	[11,557] ?	?	?	?	?	?	?	
11—3h		18,821 [68,998]	[17,249]	66,745	16,686	0,748	4532,1	121,6	30,4										
3—7h		20,24 [74,198]	[18,549]	70,797	17,699	0,758	5212,1	131,4	32,8										
7—7h 30 [8h]	200 Wasser	4,172 [15,293]	[15,293]	14,917	14,917	—	—	12,95	25,9										23,4
7h 30 [8h] —1h		16,419 [60,191]	[12,038]	60,676	12,135	0,716	6019,3	104,6	19,0	236	1031	6,124	0,510	4,385	1,592	—	1,06	0,716	
1—7h		16,575 [60,761]	[12,152]	61,414	12,283	0,716	6984,1	115,6	19,25										23,05
Total 7—7h	140 g Pferdefl. 120 g Kaseïn 23 g Fleischextr. 17,5 g Schweinefett 700 Wasser	95,052	—	339,26	—	—	—	580,2	—	?	—	[17,681]	—	?	?	—	?	—	Mittel 23,2

Bei der Berechnung ergibt sich, daß das O_2-Bedürfnis des nach Abzug des Eiweiß-C bleibenden C-Restes um etwa 3 g kleiner ist als der gefundene Wert. N im Harn dürfte daher nur ein Geringes zu hoch angenommen sein.

[C] Kalorien	aus Eiweiß	Fett	Kohlehydrat	Total
	[54,26] ? 459,7 ?	[49,79] ? 612,4 ?	— —	1072,1

Versuch II. Dritter Tag.

11. bis 12. April 1906.

Periode	Nahrung	Respiration: C [CO_2] in der Atemluft		O_2-Aufnahme		R. Q.	Ventilation	H_2O durch Lungen u. Haut		Harn: Harnmenge	Spez. Gew.	N		C	H	NH_3	P_2O_5	C/N	Körpergewicht
		in toto	stdl.	in toto	stdl.			in toto	stdl.			in toto	stdl.						
7—8h [8h 30]	200 Wasser	4,635 [17,386]	[11,591]	17,686	11,971	—	—	16,36	16,36										23,05
8h [8h 30] —11h		7,351 [27,576]	[11,03]	28,25	11,30	0,706	2905,6	40,4	13,47	122	1033	2,801	0,233	2,525	0,625	—	0,442	0,901	
11—3h		13,114 [48,076]	[12,019]	46,991	11,748	0,740	5343,9	78,5	19,6										
3—7h		12,967 [47,536]	[11,884]	47,079	11,77	0,730	5226,5	62,9	15,6										
7—7h 30 [8h]		3,224 [11,453]	[11,453]	11,603	11,603	—	—	7,2	14,41										22,90
7h 30 [8h] —1h		15,035 [55,117]	[11,023]	57,146	11,436	0,694	6717,1	72,7	13,22	115	1033	2,431 ?	0,203	2,172	0,584	—	0,555	0,893	
1—7h		18,775 [1])	—	69,585 [1])	—	—	—	81,5	13,58										22,70
Total 7—7h	200 Wasser	75,101	—	278,340	—	—	—	359,6	—	237	—	5,232	—	4,697	1,209	—	0,997	—	Mittel 22,88

[1]) Mittelzahlen aus den übrigen Perioden.

[C] Kalorien	aus Eiweiß	Fett	Kohlehydrat	Total
	[13,39] 130,8	[61,71] 759	— —	889,8

Versuch III. Erster Tag.

17. bis 18. April 1906.

Periode	Nahrung	Respiration								Harn									Körpergewicht
		C [CO_2] in der Atemluft		O_2-Aufnahme		R. Q.	Ventilation	H_2O durch Lungen u. Haut		Harnmenge	Spez. Gew.	N		C	H	NH_3	P_2O_5	C/N	
		in toto	stdl.	in toto	stdl.			in toto	stdl.			in toto	stdl.						
7—8h [8h 30]	100 Wasser	4,269 [15,652]	[10,435]	16,08	10,72	—	—	15,7	15,7										23,85
8h [8h 30] —11h		7,116 [26,088]	[10,435]	26,798	10,72	0,704	2998,7	47	15,7	148	1022		0,18	1,684	0,749	—	0,546	0,80	
11—3h		12,253 [44,918]	[11,229]	43,78	10,94	0,742	4938,7	65,5	16,6			2,10							
3—7h		12,641 [46,341]	[11,585]	44,927	11,232	0,746	4987,6	62,8	15,7										
7—7h 30 [8h]	110 Wasser	3,004 [11,265]	[11,265]	11,063	11,063	—	—	7,52	15,05										23,6
7h 30 [8h] —1h		14,93 [54,733]	[10,946]	54,476	10,895	0,727	5953,2	79,1	14,4	96	1031	2,34	0,20	1,684	0,749	—	0,365	0,72	
1—7h		16,50 [61,086]	[10,181]	62,03	10,34	0,712	6573,4	76,3	12,7										23,4
Total 7—7h	210 Wasser	70,71	—	259,15	—	—	—	353,9	—	244	—	4,440	—	3,368	1,498	—	0,911	—	Mittel 22,88

	aus Eiweiß	Fett	Kohlehydrat	Total
[C] Kalorien	[11,37] 111,0	[58,44] 718,8	[0,90] 8,5	838,3

Versuch III. Zweiter Tag.

18. bis 19. April 1906.

Periode	Nahrung	Respiration: $C[CO_2]$ in der Atemluft in toto	$C[CO_2]$ stdl.	O_2-Aufnahme in toto	O_2-Aufnahme stdl.	R. Q.	Ventilation	H_2O durch Lungen u. Haut in toto	H_2O stdl.	Harn: Harnmenge	Spez. Gew.	N in toto	N stdl.	C	H	NH_3	P_2O_5	C/N	Körpergewicht
7—8h [8h 30]	120 g Glutenkaseïn, 140 g Pferdefl., 23 g Fleischextr., 17,5 g Schweinefett, 116,5 Wasser	4,979 [18,254]	[12,167]	18,10	12,07	—	—	24,05	16,03										23,4
8h [8h 30] —11h		11,012 [40,37]	[16,148]	38,801	15,52	0,744	2980,7	68,3	22,8	270	1033	10,40	0,867	5,770	2,272	—	0,546	0,555	
11—3h		17,216 [64,581]	[16,145]	60,043	15,01	0,778	4911,8	130,7	32,7										
3—7h		17,317 [63,483]	[15,87]	60,207	15,052	0,763	5263,6	121,8	30,4										
7—7h 30 [8h]	200 Wasser	3,681 [13,809]	[13,809]	13,218	13,218	—	—	11,6	23,2										23,15
7h 30 [8h] —1h		16,024 [58,743]	[11,748]	56,923	11,384	0,746	5942,0	88,8	16,1	206	1030	7,175	0,598	4,851	1,380	—	0,826	0,676	
1—7h		18,877 [69,202]	[11,534]	68,689	11,448	0,727	6862,9	94,1	15,7										22,85
Total 7—7h	120 g Glutenkaseïn, 140 g Pferdefl., 23 g Fleischextr., 17,5 g Schmalz, 316,5 Wasser	89,106	—	315,981	—	—	—	539,35	—	476	—	17,575	—	10,621	3,652	—	1,372	—	Mittel 23.12

	aus Eiweiß	Fett	Kohlehydrat	Total
[C]	[44,99]	[44,116]	—	
Kalorien	456,9	542,6	—	999,5

Versuch III. Dritter Tag.

19. bis 20. April 1906.

Periode	Nahrung	Respiration: C [CO_2] in der Atemluft		Respiration: O_2-Aufnahme		Respiration: R. Q.	Respiration: Ventilation	Respiration: H_2O durch Lungen u. Haut		Harn: Harnmenge	Harn: Spez. Gew.	Harn: N		Harn: C	Harn: H	Harn: NH_3	Harn: P_2O_5	Harn: C/N	Körpergewicht
		in toto	stdl.	in toto	stdl.			in toto	stdl.			in toto	stdl.						
7—8h [8h 30]	200 Wasser	4,667 [17,118]	[11,412]	17,04	11,361	—	—	14,0	14,0										22,85
8h [8h 30] —11h		7,019 [25,733]	[10,29]	25,688	10,275	0,724	2829,3	37,0	12,3										
11—3h		11,336 [41,556]	[10,389]	40,914	10,228	0,735	5064,6	41,4	10,35	96	1037	2,38	0,20	2,101	0,926	—	0,426	0,883	
3—7h		11,992 [43,963]	[10,991]	43,45	10,86	0,732	4941,2	—	—										22,75
7—7h	200 Wasser	34,557 [126,68]	[10,557]	[125,448]	[10,454]	—	—	—	—	85	1040	2,309	0,193	1,934	0,730	—	0,265	0,838	22,8
Total 7—7h	400 Wasser	69,571	—	252,540	—	—	—	—	—	181	—	4,689	—	4,035	1,656	—	0,691	—	Mittel 22,8

[C] Kalorien	aus Eiweiß	Fett	Kohlehydrat	Total
	[12,00] 117,2	[54,82] 674,3	[2,75] 26,1	817,6

Versuch IV. Erster Tag.

23. bis 24. Mai 1906.

Periode	Nahrung	Respiration: $C[CO_2]$ in der Atemluft in toto	$C[CO_2]$ stdl.	O_2-Aufnahme in toto	O_2-Aufnahme stdl.	R. Q.	Ventilation	H_2O durch Lungen u. Haut in toto	H_2O stdl.	Harn: Harnmenge	Spez. Gew.	N in toto	N stdl.	C	H	NH_3	P_2O_5	C/N	Körpergewicht
7—8ʰ [8ʰ 30]	200 Wasser	4,823 [17,68]	[11,79]	18,267	12,178	—	—	16,8	16,8										24,03
8ʰ [8ʰ 30] —11ʰ		8,041 [29,477]	[11,79]	30,445	12,178	0,705	3226,2	50,5	16,8										
11—3ʰ		13,523 [49,574]	[12,393]	48,547	12,137	0,738	5223,6	69,5	17,6	107	1030	2,576	0,216	—	—	—	—	—	
3—7ʰ		13,92 [51,033]	[12,758]	50,084	12,52	0,737	5267,5	87,6	21,9										
7—7ʰ 30 [8ʰ]	200 Wasser	3,422 [12,544]	[12,544]	12,230	12,23	—	—	9,9	18,9										23,72
7ʰ 30 [8ʰ] —1ʰ		16,825 [61,68]	[12,33]	59,760	11,95	0,746	6057,4	87,4	16,0	105	1032	2,654	0,221	2,366	0,567	0,238	—	0,891	
1—7ʰ		19,962 [73,182]	[12,197]	73,157	12,193	0,723	7257,3	120,3	20,05										23,47
Total 7—7ʰ	400 Wasser	80,516	—	292,490	—	—	—	442,0	—	212	—	5,230	—	—	—	—	—	—	Mittel 23,75

Versuch IV. Zweiter Tag.

24. bis 25. Mai 1906.

Periode	Nahrung	Respiration: C[CO_2] in der Atemluft		O_2-Aufnahme		R. Q.	Ventilation	H_2O durch Lungen und Haut		Harn: Harnmenge	Spez. Gew.	N		C	H	NH_3	P_2O_5	C/N	Körpergewicht
		in toto	stdl.	in toto	stdl.			in toto	stdl.			in toto	stdl.						
7—8h [8h 30]	120 g Kaseïn hydrolysiert 140 g Pferdefl. 23 g Fleischextrakt 17,5 g Schweinefett 530 Wasser	5,711 [20,935]	[13,597]	20,034	13,356	—	—	21,42	21,42										25,47
8h [8h 30] —11h		11,183 [40,995]	[16,398]	39,207	15,683	0,753	2899,8	68,5	22,8	252	1052	10,598	0,883	7,240	1,651	2,125	2,47	0,683	
11—3h		18,439 [67,594]	[16,898]	64,841	16,21	0,754	4651,2	130,6	32,82										
3—7h		16,785 [61,533]	[15,383]	60,341	15,085	0,737	4715,4	107,5	26,9										
7—7h 30 [8h]	kein Wasser	3,823 [14,016]	[14,016]	14,016	14,016	—	—	11,9	23,9										23,55
7h 30 [8h] —1h		17,252 [63,244]	[12,649]	64,689	12,938	0,707	5763,4	115,3	21,0	198	1041	7,240	0,603	5,691	1,531	0,738	0,80	0,821	
1—7h		21,123 [77,433]	[12,905]	74,995	12,499	0,746	6993,5	112,5	18,75										23,00
Total 7—7h	120 g Kaseïn hydrolysiert 140 g Pferdefl. 23 g Fleischextrakt 17,5 g Schweinefett 530 Wasser	94,316	—	338,123	—	—	—	567,7	—	450	—	17,838	—	12,931	3,182	2,863	3,27	—	Mittel 23,34

Versuch IV. Dritter Tag.

25. bis 26. Mai 1906.

Periode	Nahrung	Respiration: $C[CO_2]$ in der Atemluft		O_2-Aufnahme		R. Q.	Ventilation	H_2O durch Lungen u. Haut		Harn: Harnmenge	Spez. Gew.	N		C	H	NH_3	P_2O_5	C/N	Körpergewicht
		in toto	stdl.	in toto	stdl.			in toto	stdl.			in toto	stdl.						
7—8^h [8^h 30]		4,949 [18,144]	[12,095]	19,42	12,95	—	—	15,77	15,77										23,00
8^h [8^h 30] —11^h		7,696 [28,213]	[11,285]	28,489	11,396	0,724	3101,9	38,5	12,8										
11—3^h		13,027 [47,757]	11,930	46,622	11,65	0,741	4830,7	59,2	14,8	95	1039	3,472	0,29	2,868	0,673	0,503	0,480	0,826	
3—7^h		14,011 [51,364]	12,84	50,651	12,663	0,733	4723,3	89,0	22,2										22,75
Ab-grenzung																			
Total 7—7^h		39,683	—	145,182	—	—	—	199,5	—	95	—	3,472	—	2,868	0,673	0,503	0,480	—	Mittel 22,87

selben Hunde gemacht, der in gleicher Weise wie der Respirationsversuch ausgeführt wurde, nur daß der Hund sich nicht im Respirationskasten befand. Beide Male behielt das Tier die eingeführte Nahrung gut bei sich Die N-Kurve verlief im Vorversuch ähnlich wie im Respirationsversuch; auch die P_2O_5- und Ammoniakausscheidung, die im Vorversuch nur für die erste 12 stündige Periode nach der Fütterung bestimmt wurde, gab übereinstimmende Werte (2,62 bzw. 1,67 g gegenüber 2,12 bzw. 2,47 g). Der Versuch wurde am 25. V., abends 7 Uhr, abgebrochen.

Das hydrolisierte Kaseïn war in der Weise gewonnen worden, daß Kaseïn. techn. (Merck) ein Jahr lang mit Pankreatin Rhenania behandelt worden war. 1 kg Kaseïn wurde in 10 Liter Aq. destill. aufgeschwemmt und nach Zusatz von Pankreatin und Natr. bicarb. in der Brutkammer stehen gelassen. Im Laufe der Zeit wurde häufig umgeschüttelt und mehrere Male frisches Pankreatin zugefügt. Die gesamte Verdauungsflüssigknit inkl. Bodensatz wurde dann im Vakuum bei einer 40° C nicht überschreitenden Temperatur eingedampft, woraus eine harte Masse resultierte, welche pulverisiert werden konnte. Das Pulver war schwach gelblich gefärbt und äußerst hygroskopisch. Nach dem Pulvern wurde die Substanz nochmals im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet; sie gab nur bei der Ringprobe eine Spur Biuretreaktion.

Die Analyse der Substanz ergab: N = 12,41 Proz., C = 46,695 Proz., H = 7,809 Proz., Asche = 2,648 Proz., Cal pro 1 g = 4,89 Proz.

Die Abgrenzung des Kotes erfolgte im Respirationsversuch erst um 7 Uhr abends des ersten Versuchstages, die Schlußabgrenzung bereits um 7 Uhr abends des dritten Versuchstages. Die Bilanzen beziehen sich natürlich auf das zwischen diesem Zeitpunkt gelegene Intervall von 48 Stunden.

Der Kot war im Vorversuch von dickbreiiger Beschaffenheit, im Hauptversuch geformt. Er wog im letzteren feucht 160 g, trocken 20 g, N = 1,74 g, C = 9,41 g, H in der Trockensubstanz = 1,10 g, Asche = 2,8 g, Cal = 74,2. Es geht aus diesen Zahlen hervor, daß das hydrolysierte Kaseïn vorzüglich resorbiert worden war.

Leider wurde bei diesem Hunde nie der Hungerkot untersucht, deshalb wurde bei einem gleich großen, 23 kg schweren Hunde der Hungerkot während vier Tagen bestimmt.

Berechnung.

Zunächst seien die Resultate der Analysen von Harn und Kot zusammengestellt, wobei die für den Hungerkot angegebenen Zahlen von einem anderen Hunde stammen (s. o.).

Urin	C	N	H	Asche	O	Trockensubstanz	Cal
23/24 B	2,366	2,654	0,564	1,552	2,320	9,456	22,962
24/25 A	7,240	10,598	1,651	5,763	4,648	29,900	78,820
24/25 B	5,945	7,240	1,531	2,635	5,789	23,140	60,288
25/26 A	2,868	3,472	0,673	0,990	2,653	10,656	29,563
Total	18,419	23,964	4,419	10,940	15,410	73,152	191,633
Fütterungskot . .	9,41	1,74	1,10	2,80	4,95	20,0	74,24
Hungerkot . . . (Tagesmenge)	1,12	0,14	0,18	0,77	0,79	3,0	11,44

I. Berechnung der Resultate des ersten Hungertages.

Für die zweite Hälfte des Tages läßt sich die genaue Berechnung in folgender Weise durchführen:

Vom Körper wurden abgegeben:

Kot[1]	0,562 g C,	0,089 g H,	0,395 g O,	0,069 g N
Harn	2,366 „ „	0,564 „ „	2,320 „ „	2,654 „ „
Total	2,928 g C,	0,653 g H,	2,715 g O,	2,723 g N

Nehmen wir mit Zuntz[2]) an, daß 16,65 g N 100 g asche- und fettfreiem Fleisch entsprechen, so entsprechen 2,723 g N

$$\frac{2,723 \times 100}{16,65} = 16,36 \text{ g asche- und fettfreiem Fleisch.}$$

100,00 g Fleisch =	52,38 g C,	7,27 g H,	22,68 g O,	16,650 g N
16,36 „ „ =	8,57 „ „	1,19 „ „	3,71 „ „	2,723 „ „

davon fallen ab in Harn und Kot:

2,93 g C, 0,65 g H, 2,71 g O, 2,723 g N,

also ausgeschieden

als CO_2 und H_2O, 5,64 g C, 0,54 g H, 1,00 g O

5,64 g C brauchen zur Oxydation	5,64 × 2,667 =	15,04 g O
0,54 g H „ „ „	0,54 × 7,920 =	4.28 „ „
		19,32 g O
Davon stammt aus verbranntem Körpereiweiß . . .		1,00 „ „
Daher kommen aus aufgenommenem O		18,32 g O

In der Respirationsluft sind abgegeben	40,21 g C, aufgenommen	145,15 g O
davon gehen ab für Eiweiß	5,64 „ „	18,32 „ „
verbleiben für Kohlehydrate und Fett .	34,57 g C	126,87 g O

1 g C aus Kohlehydrat braucht zur Oxydation 2,651 g O
1 „ „ „ Fett „ „ „ 3,751 „ „

daraus berechnet sich C aus Kohlehydrat	2,50 g	(5,62 g Glykogen)
C „ Fett	32,07 g	(41,90 g Fett)
	34,57 g	

Kalorienberechnung.

16,36 g C aus Eiweiß =	16,36 × 5,631 =	92,1 Cal
2,50 „ „ „ Glykogen =	2,50 × 9,500 =	23,7 „
32,06 „ „ „ Fett =	32,07 × 12,300 =	394,5 „
	Total	510,3 Cal

Abfall im Kot	5,7 Cal	
„ „ Harn	23,0 „	
	28,7 Cal	28,7 Cal
	Es bleiben	481,6 Cal.

[1]) Gewonnen von einem anderen Tiere gleicher Größe (s. o.)

[2]) Zuntz, Höhenklima und Bergwanderungen, S. 102. Berlin 1906.

Für die erste Hälfte des Hungertages läßt sich diese Art der Berechnung nicht durchführen, da im Urin nur der N bestimmt wurde, doch können wir mit Hilfe von Standardzahlen die Wärmeproduktion berechnen.

Wenn wir die Berechnung mit den Zuntzschen Zahlen[1]) durchführen, so erhalten wir:

	aus Eiweiß	aus Fett	aus Kohlehydrat	Total
C in der Exspirationsluft . .	6,60	32,59	1,13	40,32
Kalorien	64,4	400,5	10,7	465,6

Um zu prüfen, ob diese Berechnung berechtigt ist, können wir die gleiche Berechnung für die zweite Hälfte des Hungertages mit Hilfe der Standardzahlen ausführen. Wir erhalten dann:

	aus Eiweiß	aus Fett	aus Kohlehydrat	Total
C in der Exspirationsluft . .	6,79	31,03	2,38	40,21
Kalorien	66,3	381,7	22,6	470,6

Mit der oben durchgeführten genaueren Berechnung erhalten wir 481,6 Cal.

II. Berechnung der Resultate des Fütterungstages und der anschließenden Hungerperiode.

In der Nahrung wurden eingeführt:

	C	N	H	O	Asche
Hydrolysiert. Kaseïn:	56,03 g C,	14,89 g N,	9,37 g H,	36,53 g O,	3,18 g Asche
Übrige Nahrung[2]) .	38,56 „ „	6,12 „ „	6,09 „ „	17,93 „ „	7,36 „ „
Total	94,59 g C,	21,01 g N,	15,46 g H,	54,46 g O,	10,54 g Asche

Im Kot wurden

	C	N	H	O	Asche
in toto ausgeschieden . .	9,41 g C,	1,74 g N,	1,10 g H,	4,95 g O,	2,80 g Asche
Abzug für Hungerkot . .	1,12 „ „	0,14 „ „	0,18 „ „	0,79 „ „	0,77 „ „
Bleiben als Fütterungskot	8,29 g C,	1,60 g N,	0,92 g H,	4,16 g O,	2,03 g Asche

	C	N	H	O	Asche
In der Nahrung	94,59 g C,	21,01 g N,	15,46 g H,	54,46 g O,	10,54 g Asche
Im Kot d. Fütterungstages	8,29 „ „	1,60 „ „	0,92 „ „	4,16 „ „	2,03 „ „
Also resorbiert	86,30 g C,	19,41 g N,	14,54 g H,	50,30 g O,	9,51 g Asche

N-Bilanz.

N resorbiert	19,41 g
N im Harn des Fütterungstages . . .	17,84 „
retiniert	1,57 g N.

Es sind also 1,57 g N im Körper zurückbehalten worden. Da wir nicht wissen, ob die diesem N entsprechende Menge von hy-

[1]) Magnus-Levy, Physiol. des Stoffwechsels in v. Noordens Handbuch d. Pathologie des Stoffwechsels. 2. Aufl., S. 205.

[2]) Für Schweineschmalz berechnet; in Fleisch und Extrakt wurden C, N, H, Asche und Kalorien direkt bestimmt.

drolysiertem Kaseïn am Fütterungstage verbrannt worden ist und nur die Ausscheidung der Endprodukte verzögert wurde, oder ob auch die Zersetzung erst am folgenden Tage stattgefunden hat, so können wir die Berechnung der Wärmeproduktion nicht für diesen Tag allein durchführen, sondern wir müssen den nachfolgenden Hungerhalbtag mit in die Berechnung ziehen. Es ist deshalb zu den Verlusten durch den Kot des Fütterungstages der Verlust im Kot des Hungerhalbtages wieder zu addieren.

	C	N	H	O
Resorbiert waren	86,30 g C,	19,41 g N,	14,54 g H,	50,30 g O
Im Hungerkot vom 25./26. V., 1. Periode	0,56 „ „	0,07 „ „	0,09 „ „	0,40 „ „
Es bleiben	85,74 g C,	19,34 g N,	14,45 g H,	49,90 g O

Wir erhalten dann folgende N-Bilanz:

Im Harn des Fütterungstages	17,84 g N
„ „ „ folgenden Hungertages	3,47 „ „
	21,31 g N
Aus der Nahrung wurden resorbiert	19,34 „ „
Aus eingeschmolzenem Körpereiweiß	1,97 g N

Nach Zuntz berechnet sich daraus $\frac{1{,}97 \times 100}{16{,}65} = 11{,}83$ g Eiweiß.

Also stammen

	C	N	H	O
aus eingeschmolzenem Körpereiweiß	6,20 g C,	1,97 g N,	0,86 g H,	2,86 g O
aus der Nahrung	85,74 „ „	19,34 „ „	14,45 „ „	49,90 „ „
aus Nahrung und Körpereiweiß . .	91,94 g C,	21,31 g N,	15,31 g H,	52,58 g O
Im Harn erschienen	16,05 „ „	21,31 „ „	3,85 „ „	13,19 „ „
Es bleiben	75,89 g C,	—,— g N,	11,46 g H,	39,49 g O

75,89 g C brauchen zur Bildung von CO_2 . . .	75,89 × 2,667 =	202,40 g O
11,46 g H „ „ „ „ H_2O . . .	11,46 × 7,940 =	90,99 „ „
		293,39 g O
Aus der Nahrung stammen		39,49 „ „
Also aufgenommen		253,99 g O

In der Atemluft sind abgegeben	134,00 g C, aufgenommen	483,30 g O
Davon gehen ab für Nahrung und Körper-Eiweiß	75,89 „ „	253,90 „ „
Es bleiben für Körperfett (und Kohlehydrate)	58,11 g C	229,40 g O

58,11 g C hätten als Fett ein O-Bedürfnis von 58,11 × 3,751 = 217,97 g O.

Bedenkt man, aus wieviel Faktoren sich diese Berechnung zusammensetzt und daß kleine Fehler bei der Aufstellung derselben nicht zu vermeiden sind, so wird man diese Übereinstimmung der Sauerstoffzahlen eine zufriedenstellende nennen.

Kalorienberechnung.

In der Nahrung finden sich:

Hydrolysiertes Kaseïn	586,8 Cal
Mischung von Fleisch, Extrakt und Fett	457,1 „
Total	1043,9 Cal
Abfall im Kot (Fütterungskot, Hungerkot d. Halbtags 74, 2 — 5, 7) =	68,5 „
	975,4 Cal
Dazu aus eingeschmolzenem Körpereiweiß	66,6 „
	1042,0 Cal
Im Harn	168,7 „
	873,3 Cal
Dazu aus Körperfett (58,11 × 12,3)	714,8 „
	1588,1 Cal

Nehmen wir nun an, die Hungerzersetzung sei am Tage nach der Fütterung die gleiche gewesen wie am Tage vor der Fütterung, so hätten wir für den halben Tag nach der Fütterung 481,6 Cal in Abzug zu bringen.

	1588,1 Cal
	481,6 „
Es bleiben	1106,5 Cal
An den beiden Hungerhalbtagen 2 × 481,6	963,2 „
Also eine Wärmesteigerung von	143,3 Cal

Dabei ist aber zu erwägen, daß die Hungerzersetzung jedenfalls abgesunken wäre; tatsächlich haben wir auch bei den Versuchen mit anderen Eiweißkörpern ein Absinken der Wärmeproduktion am Tage nach der Fütterung gegenüber dem Tage vor derselben um 7 bis 20 Cal beobachtet. Wir können die Wärmeproduktion der Hungerperiode, die dem Fütterungstage folgt, annähernd berechnen unter der Annahme, die am Fütterungstage retinierten 1,57 g N stammten aus unverbranntem, hydrolysiertem Kaseïn, und dieses sei in den folgenden zwölf Stunden zur Zersetzung gelangt. Wir erhalten dann folgende Rechnung:

Im Urin	2,868 g C,	3,472 g N,	0,673 g H,	2,653 g O
Im Kot	0,562 „ „	0,069 „ „	0,089 „ „	0,395 „ „
Verluste	3,430 g C,	3,541 g N,	0,762 g H,	3,048 g O

Daraus berechnet sich eine Zersetzung von

hydrolys. Kaseïn $\frac{1{,}57 \times 100}{12{,}41} = 12{,}66$ g mit	5,91 g C,	1,57 g N,	0,99 g H,	3,85 g O
Körpereiweiß $\frac{1{,}97 \times 100}{16{,}65} = 11{,}83$ „ „	6,20 „ „	1,97 „ „	0,86 „ „	2,68 „ „
Summe	12,11 g C,	3,52 g N,	1,85 g H,	6,53 g O
Im Harn und Kot erschienen	3,43 „ „	3,54 „ „	0,76 „ „	3,05 „ „
In der Atemluft	8,68 g C,	0,00 g N,	1,09 g H,	3,48 g O

8,68 g C brauchen zur Bildung von CO_2 8,68 × 2,667 = 23,15 g O
1,09 g H „ „ „ „ H_2O 1,09 × 7,920 = 8,63 „ „
Summe 31,78 g O
Aus Nahrung und Körpereiweiß stammen . . . . . . 3,48 „ „
also aus der Inspirationsluft . . . . 28,30 g O

In der Atemluft wurden abgegeben . .	39,68 g C,	aufgenommen 145,18 g O
Davon gehen ab f. Nahrung u. Körpereiweiß	8,68 „ „	28,30 „ „
Es bleiben für Körperfett	31,00 g C	116,88 g O

Die 31,00 g C entsprechende Fettmenge würde zur Oxydation brauchen 31,00 × 3,751 = 116,28 g O.

Kalorienberechnung.

Aus hydrolysiertem Kaseïn	12,66 × 4,890 =	61,9 Cal
„ Körpereiweiß	11,83 × 5,631 =	66,6 „
„ Körperfett	31,00 × 12,3 =	381,3 „
	Summe	509,8 Cal
Abfall im Harn	29,56	
„ „ Kot	5,72	35,3 „
	35,28	474,5 Cal

Der richtige Wert für die Wärmeproduktion des Fütterungstages wäre also 1588,1 — 474,5 = 1113,6 Cal. Als Hungerzersetzung wäre zu erwarten gewesen am 24. bis 25. V. 481,6 + 474,5 = 956,1 Cal und die spezifisch-dynamische Wirkung berechnet sich auf 1113,6 — 956,1 = 157,5 Cal.

Versuch V (s. Tabelle S. 362 und 363).

Bemerkungen. 1. Die Berechnung der Wärmeproduktion und der Beteiligung von Eiweiß, Fett und Kohlehydraten an der Verbrennung wurde in diesem wie im Versuch I auch für 12stündige Perioden durchgeführt.

2. Die Zufuhr bestand aus 688 g Pferdefleisch und 200 g Lävulose (Schering). Der Hund fraß zuerst das Fleisch; dann wurde die in Wasser gelöste Lävulose durch eine Schlundsonde eingegossen.

3. Der Kot dieser Periode (24 Stunden) wog feucht 88 g, trocken 27,6 g, N = 2,83 g, C = 10,98 g, Cal = 115,9, H in der Trockensubstanz = 1,394 g.

4. Der Hund erbrach kurze Zeit, nachdem die Schlundsonde entfernt worden war, geringe Mengen einer dünnbreiigen Masse. Das Erbrochene wurde sorgfältig von dem Steinboden aufgenommen, die letzten Reste mit einer bestimmten Menge trockenen Filtrirpapieres aufgetupft und nach Zusatz von Oxalsäure auf dem Wasserbade eingedampft. Das Erbrochene wog feucht 114 g, trocken 37 g, nach Abzug der Oxalsäure und des Filtrirpapieres 33 g. N = 1,645 g, C = 13,465 g (nach Abzug des in der Oxalsäure und im Filtrierpapier enthaltenen C), H in der Trockensubstanz = 1,471 g (nach Abzug des in der Oxalsäure und im Filtrierpapier enthaltenen H). Die Fleischtrockensubstanz enthielt 12,2 Proz. N; 1 g N entspricht daher = 8,2 g Trockensubstanz, 1,645 g N entsprechen daher 1,645 × 8,2 = 13,47 g Fleisch-

Versuch V.
25. bis

Periode	Nahrung	Respiration					
		C[CO_2] in der Atemluft		O_2-Aufnahme		R. Q.	Ventilation
		in toto	stdl.	in toto	stdl.		
7—8h [8h 30]	200 g Lävulose 688 g Pferdefleisch 260 Wasser	6,091 [22,33]	[14,88]	20,42	13,61	—	—
8h [8h 30] —11h		12,945 [47,457]	[18,98]	38,795	15,518	0,885	3478,6
11—3h		20,523 [75,238]	[18,809]	62,981	15,745	0,864	5212,8
3—7h		16,346 [59,923]	[14,981]	51,818	12,954	0,836	4238,7
7—7h 30 [8h]	200 Wasser	4,000 [14,665]	[14,665]	12,685	12,685	—	—
7h 30 [8h] —1h		19,571 [71,747]	[14,349]	62,083	12,416	0,836	6202,9
1—7h		16,836 [61,72]	[12,34]	53,218	10,644	0,839	6003,2
Respirationsversuch beendet							
Total 7—7h	200 g Lävulose 688 g Pferdefleisch 460 Wasser	96,312	—	302,000	—	—	—

26. bis 27. Mai 1906.

Periode	Nahrung	Respiration					
		C[CO_2] in der Atemluft		O_2-Aufnahme		R. Q.	Ventilation
		in toto	stdl.	in toto	stdl.		
7—7h	200 Wasser	—	—	—	—	—	—

Ein Tag.
26. Mai 1906.

H_2O durch Lungen u. Haut in toto	H_2O durch Lungen u. Haut stdl.	Harn: Harnmenge	Spez. Gew.	N in toto	N stdl.	C	H	NH_3	P_2O_5	C/N	Körpergewicht
23,95	23,95										22,75
77,5	29,2	180	1056	6,580	0,548	6,413	1,814	0,408	1,196	0,975	
112,0	28,0										
118,0	28,5										
11,3	22,6										22,35
91,5	16,7	176	1042	7,084	0,590	4,308	1,217	0,435	? —	0,608	
98 5	16,4										23,05
532,75	—	356	—	13,664	—	10,721	3,231	0,843	?	—	Mittel 22,9

[C] Kalorien	aus Eiweiß	Fett	Kohlehydrat	Total
7—7h . . .	[16,84] 171,1	[13,50] 158,6	[25,50] 242,8	572,2
7—7h . . .	[18,14] 184,2	[8,26] 109,1	[14,02] 133,2	426,5
Total . . .	[34,98] 355,3	[21,76] 267,7	[39,58] 376,0	999,0

H_2O durch Lungen u. Haut in toto	H_2O durch Lungen u. Haut stdl.	Harn: Harnmenge	Spez. Gew.	N in toto	N stdl.	C	H	NH_3	P_2O_5	C/N	Körpergewicht
—	—	134	1031	3,640	0,303	2,190	0,653	—	0,40	0,602	—

trockensubstanz. Die Gesamttrockensubstanz des Erbrochenen betrug 33 g. Es können daher mit dem Erbrochenen höchstens 33 — 13,47 = 19,53 g Lävulose verloren gegangen sein.

Die Gesamtlävuloseeinfuhr beläuft sich demnach auf 180,47 g.

2. Teil. Besprechung der Resultate.

(Siehe Generaltabelle I bis III).

A. Die Nüchternversuche.

Zuerst sei erwähnt, daß die R. Q. in den einzelnen Nüchternversuchen nur sehr geringe Schwankungen zeigen. Dies geht aus der Generaltabelle II sehr deutlich hervor. Die Zahlen sind viel gleichmäßiger als die der Zuntzschen Schule. Sie sind auch niedriger. Dies Verhalten dürfte zum größten Teil seinen Grund darin haben, daß unseren Versuchen längere Hungerperioden vorausgegangen sind.

Die Berechnung der Beteiligung von Eiweiß, Fett und Kohlehydraten an der Zersetzung ergibt, daß an den Nüchterntagen Kohlehydrate nur am ersten Versuchstage des I. und IV. Versuchs in erwähnenswerter Weise teilnehmen. Es sind dies diejenigen Versuche, in welchen sich der Hund in einem besseren Ernährungszustande befand; beiden ist eine längere Periode reichlicher Ernährung vorausgegangen. Die kleineren an den übrigen Hungertagen [1]) auftretenden Werte fallen noch in die Fehlergrenzen der Methode. Der Umstand, daß in den späteren Versuchen die für den O_2-Verbrauch berechneten Werte mit den gefundenen bis auf wenige Gramme übereinstimmen, dürfte der Beweis für die Zuverlässigkeit unserer Methode sein. Gleichzeitig zeigt er auch, daß die von Rubner angewandte indirekte Kalorimetrie bei ausschließlicher Eiweiß-Fettkost, wenn mehrtägiges Hungern vorausging, berechtigt ist.

Aus der Generaltabelle I ergibt sich, daß die Gesamtwärmeproduktion an den Nüchterntagen im Verlauf der ersten drei Versuche allmählich abnimmt, und zwar von 904,0 Cal im ersten Versuch, erster Tag, auf 817,6 Cal im dritten Versuch, dritter Tag.

---

[1]) Der Wert von 26 Kalorien aus Kohlehydratverbrennung am dritten Tage des III. Versuches ist zu unsicher, um nach dieser Richtung hin verwertet werden zu können. Hier fehlen Bestimmungen der CO_2-Produktion und des O_2-Verbrauches während der Nacht. Die in der Tabelle stehenden Werte sind Mittelwerte aus der Tagesperiode.

Generaltabelle I.

Nummer des Versuches	Gesamt-Kalorien-produktion	Überschuß der Kalorien-produktion am Fütterungstage	Überschuß in Proz. der Kalorien-zufuhr	H_2O-Abgabe durch Lungen und Haut	Kalorien aus Wasserver-dampfung	Kalorien-Plus am Fütterungs-tage	Wasserver-dampfung pro Kilogramm in der Stunde	Kalorien pro Kilogramm und Stunde		Anteil der Wasserver-dampfung an der Wärme-abgabe in Proz.	CO_2-Abgabe	O_2-Aufnahme
								total	aus Wasserver-dampfung			
I. 1. Tag	904,0	—	—	428,2	256,9	—	0,75	1,58	0,45	28,5	77,639	277,915
2. „	**1087,9**	187,4	18,16	**558,5**	**331,5**	91,25	**0,99**	**1,92**	**0,59**	**30,7**	**96,033**	**341,576**
3. „	897,0	—	—	372,6	223,6	—	0,66	1,60	0,80	25,0	77,68	279,94
II. 1. „	899,6	—	—	376,3	225,8	—	0,67	1,60	0,40	25,0	75,35	277,39
2. „	**1072,1**	177,4	15,71	**580,2**	**348,1**	127,3	**1,04**	**1,92**	**0,62**	**32,3**	**95,05**	**339,26**
3. „	889,8	—	—	359,6	215,8	—	0,64	1,55	0,38	24,5	75,101	278,340
III. 1. „	838,3	—	—	353,9	212,3	—	0,62	1,48	0,37	25,0	70,71	259,15
2. „	**999,5**	171,6	15,02	**539,3**	**323,6**	111,3	**0,97**	**1,80**	**0,58**	**32,2**	**89,106**	**315,981**
3. „	817,6	—	—	?	?	—	?	1,53	?	?	69,571	252,540
IV. 1. „	947,2	—	—	442,0	265,2	—	0,78	1,66	0,47	28,0	80,516	292,490
2. „	**1113,6**	157,5	15,1	**567,7**	**340,6**	88,3	**1,01**	**1,99**	**0,61**	**30,6**	**94,316**	**338,133**
3. „	949,4	—	—	399,0	239,4	—	0,70	1,73	0,42	25,2	75,366	290,369
nur 12 stündig, auf 24 stündig berechnet												
V. 1. Tag	**999,0**	75,5[1]	5,18	**532,7**	**319,6**	78,0[1]	**0,97**	**1,82**	**0,58**	**32,0**	**96,312**	**302,000**

[1]) Um das Plus an Kalorienproduktion und an Wasserverdampfung für Versuch V zu berechnen, sind wir von der Annahme ausgegangen, daß die Hungerzersetzung in gleichem Maße gesunken wäre wie an den vorhergehenden Tagen. Wir müssen zu diesem Zweck aber die Größe der Hungerzersetzung für die vorhergehenden Tage mit den gleichen Standardzahlen berechnen wie beim Versuch V und erhalten dann Gesamtkalorien 946,2 und 931,6, also für die zu erwartende Hungerzersetzung 923,5. An Kalorien aus Wasserverdampfung hätten wir bei Hunger zu erwarten 231,6.

Generaltabelle II.

Tag	Perioden	Versuch I mit Fleisch				Versuch II mit Kaseïn			Versuch III mit Glutenkaseïn			Versuch IV mit hydrolys. Kaseïn			Versuch V mit Fleisch u. Lävulose		
		CO_2-Abgabe stdl.	O_2-Aufnahme stdl.	R. Q.	N in Harn stdl.	CO_2-Abgabe stdl.	O_2-Aufnahme stdl.	R. Q.	CO_2-Abgabe stdl.	O_2-Aufnahme stdl.	R. Q.	CO_2-Abgabe stdl.	O_2-Aufnahme stdl.	R. Q.	CO_2-Abgabe stdl.	O_2-Aufnahme stdl.	R. Q.
1.	7—8½	—	—	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	8½—11	11,012	11,51	0,694		11,342	11,604	0,707	10,435	10,72	0,704	11,790	12,178	0,705	—	—	—
	11—3	11,938	11,823	0,730		11,180	11,147	0,708	11,229	10,940	0,742	12,393	12,137	0,738	—	—	—
	3—7	12,996	12,290	0,765	0,218	12,310	12,167	0,738	11,585	11,232	0,746	12,758	12,520	0,737	—	—	—
	7—8	—	—	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	8—1	11,181	10,781	0,748		10,926	11,117	0,711	10,946	10,895	0,727	12,330	11,950	0,746	—	—	—
	1—7	12,194	11,680	0,756		11,774	11,416	0,725	10,181	10,340	0,712	12,197	12,193	0,723	—	—	—
2.	7—8½	—	—	—	0,850	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	8½—11	19,800	18,450	0,776		19,080	17,760	0,777	16,148	15,520	0,744	16,398	15,683	0,753	18,980	15,518	0,885
	11—3	18,780	17,480	0,777	1,140	17,249	16,686	0,748	16,145	15,010	0,778	16,698	16,210	0,754	18,809	15,745	0,864
	3—7	15,820	15,580	0,736	1,280	18,849	17,699	0,758	15,870	15,052	0,763	15,383	15,085	0,737	14,981	12,954	0,836
	7—8	—	—	—	0,420	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	8—1	11,729	11,517	0,736		12,038	12,135	0,716	11,748	11,384	0,746	12,649	12,938	0,707	14,349	12,416	0,836
	1—7	11,520	11,970	0,706	0,390	12,152	12,283	0,716	11,534	11,448	0,727	12,905	12,499	0,746	12,340	10,644	0,839
3.	7—8½	—	—	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	8½—11	—	—	—		11,030	11,300	0,706	10,290	10,275	0,724	11,285	11,396	0,724	—	—	—
	11—3	11,800	11,650	0,732		12,019	11,748	0,740	10,389	10,228	0,735	11,930	11,650	0,741	—	—	—
	3—7	12,082	11,973	0,730	0,187	11,884	11,770	0,730	10,991	10,860	0,732	12,840	12,663	0,733	—	—	—
	7—8	—	—	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	8—1	11,775	11,409	0,746		11,023	11,360	0,694	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1—7	—	—	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Generaltabelle III.

Der zeitliche Ablauf in 12stündigen Perioden.

		N	C	H	P_2O_5	NH_3	C/N
Fleisch	1. Tag	2,594	2,545	0,620	0,531	0,298	0,981
		2,676	2,279	0,754	0,603	0,275	0,852
	2. Tag	13,076	8,056	2,283	1,275	0,543	0,616
		4,896	3,428	0,986	0,551	0,187	0,700
	3. Tag	2,425	2,107	0,570	0,546	0,195	0,869
		2,310	2,205	0,526	0,653	0,178	0,955
Kaseïn	1. Tag	1,867	1,438	0,372	0,587	—	0,770
		2,027	1,757	0,475	0,505	—	0,867
	2. Tag	(11,559)	—	—	—	—	—
		6,124	4,385	1,592	1,060	—	0,716
	3. Tag	2,801	2,525	0,625	0,442	—	0,901
		2,431	2,172	0,584	0,555	—	0,893
Gluten-kaseïn	1. Tag	2,100	1,684	0,749	0,546	—	0,800
		2,340	1,684	0,749	0,365	—	0,720
	2. Tag	10,400	5,770	2,272	0,546	—	0,555
		7,175	4,851	1,380	0,826	—	0,676
	3. Tag	2,380	2,101	0,926	0,426	—	0,883
		2,309	1,934	0,730	0,265	—	0,838
Hydrolys. Kaseïn	1. Tag	2,576	—	—	—	—	—
		2,654	2,366	0,564	—	0,238	0,891
	2. Tag	10,598	7,240	1,651	2,470	2,125	0,683
		7,240	5,945	1,531	0,800	0,738	0,821
	3. Tag (12 Std.)	3,472	2,868	0,673	0,480	0,503	0,826
Fleisch u. Lävulose	1. Tag	6,580	6,413	1,814	1,196	0,408	0,975
		7,084	4,308	1,217	—	0,435	0,608
	2. Tag (12 Std.)	3,640	2,190	0,653	0,400	—	0,602

Da bei unserer Versuchsanordnung auf die Woche drei Hungertage und vier Tage mit Ernährung fallen, so hat sich der Hund jedenfalls im Zustande chronischer Unterernährung befunden. Auffallend ist nun, daß, wie ebenfalls aus der Generaltabelle I ersichtlich ist, nicht nur die Gesamtkalorienproduktion, sondern auch die Kalorienproduktion pro Kilogramm Körpergewicht und Stunde absinkt: von 1,58 bis 1,60 Cal auf 1,48 bis 1,53 Cal. Im Versuch IV, dem längere Zeit hindurch reichliche Ernährung vorausgegangen ist, findet sich wieder ein höherer Anfangswert, nämlich 1,66 Cal. Dasselbe Re-

sultat gibt die Berechnung auf die Körperoberfläche. Die Berechnung, nach Rubner[1]) durchgeführt, zeigt folgendes:

	I. Versuch, 1. Tag	III. Versuch, 3. Tag
Körpergewicht	23,8 kg	22,8 kg
Kalorienproduktion	904,0 Cal	817,6 Cal
Oberfläche	0,9970 qm	0,9916 qm
Kalorienproduktion pro 1 qm Oberfläche	918,3	844,5

Dieses Verhalten stimmt mit der gewöhnlichen Annahme überein, daß „bei länger dauernder Unterernährung — — — allmählich eine Anpassung zustande kommt, so daß sich der Körper mit einer geringeren Nahrungszufuhr leidlich auf seinem Bestand erhalten kann“[2]). Dieser Annahme fehlen bisher sichere Beobachtungen, wie v. Noorden[3]) und Magnus-Levy[4]) hervorheben.

Es zeigt sich nun ferner, daß auch die Wasserverdampfung durch Lungen und Haut mit der Gesamtkalorienproduktion absinkt: von 428,2 g im ersten Versuch, erster Tag, auf 353,9 g im dritten Versuch, erster Tag (der Wert vom dritten Versuch, dritter Tag, ist nicht bestimmt worden). Es ist aber dabei zu bemerken, daß die Wasserverdampfung anfangs schneller absinkt als die Wärmeproduktion; dementsprechend beträgt der Anteil der Wasserverdampfung an der Wärmeabgabe anfangs mehr als später[5]), z. B. im ersten Versuch, erster Tag: 28,5 Proz., am dritten Tage desselben Versuches nur noch 25 Proz.; dann sinkt die Wasserverdampfung genau proportional der Wärmeproduktion, so daß das prozentische Verhältnis konstant bleibt. Die Werte für dasselbe schwanken nur zwischen 24,5 und 25,0. Dem gleichen, anfänglich rascheren Abfall der Wasserverdampfung begegnen wir auch im vierten Versuch, der, wie schon öfters bemerkt, der erste nach einer mehrwöchentlichen Pause gewesen ist. Hier beträgt der Anteil der Wasserverdampfung an der Wärmeabgabe am ersten

---

[1]) M. Rubner, Gesetze des Energieverbrauchs usw. S. 280. (Konstante = 11,9.)

[2]) Fr. Müller, Allgemeine Pathologie der Ernährung in v. Leydens Handbuch der Ernährungstherapie. II. Aufl., S. 195. Leipzig 1903.

[3]) v. Noorden, Handbuch d. Pathol. des Stoffwechsels. II. Aufl., 1, 485 (1906).

[4]) Magnus-Levy, Ebenda, S. 300. Über einen sicheren Fall von Herabsetzung der Wärmeproduktion durch hochgradige Inanition hat neuerdings Magnus-Levy [Der Einfluß von Krankheiten auf den Energiehaushalt im Ruhezustand, Zeitschr. f. klin. Medizin 60, 177 (1906)] berichtet.

[5]) Die Wärmeabgabe durch Wasserverdampfung ist berechnet durch die Annahme: 1 g verdampftes Wasser = 0,6 Cal. Vgl. Rubner, a. a. O., S. 192.

Tage 28,0 Proz., am dritten Tage 25,7 Proz. Es handelt sich hier offenbar um eine vorübergehende Störung der Wärmeregulation unter dem Einfluß der plötzlich erhöhten Temperatur, bis allmählich Gewöhnung eintritt.

Bezüglich der Nüchternversuche sei noch erwähnt, daß die von uns gefundenen Werte für den Quotienten C/N im Harn in allen Versuchen größer sind als die von Rubner[1]) angegebenen.

B. Die spezifisch-dynamische Energie.

Unter spezifisch-dynamischer Energie versteht man nach Rubner eine Erhöhung der Wärmeproduktion nach Nahrungszufuhr, welche zur Größe der Zufuhr in gesetzmäßiger Beziehung steht. Dieselbe tritt für das Eiweiß einseitig hervor.

Die Berechnung der spezifisch-dynamischen Energie erfolgt nach Rubner[2]) in folgender Weise:

Versuch I. Zufuhr = 688 g Pferdefleisch = 688 × 1,50[3]) = 1032 Cal. Im Fleisch sind enthalten 22 g Fett (direkt bestimmt). Auf das Fett kommen daher 22 × 9,3 = 204,6 Cal, auf das Fleischeiweiß 1032 — 204,6 = 827,4 Cal.

827,4 × 0,309 = 255,7
204,6 × 0,127 = 26,0

Das Plus an Kalorienproduktion hätte daher betragen sollen . . . . 281,7 Cal = 27,30 Proz. der Zufuhr.
Wir finden (s. Generaltabelle I) . . . . 187,4 „ = 18,16 „ „ „

Versuch II.

Zufuhr = 120 g Kaseïn = 120 × 5,6 = 672 Cal
Pferdefleisch 140 g, Fleischextrakt 23 g, Schweineschmalz 17,5 g . . . . 457 „ (direkt bestimmt)
Total 1129 Cal

Davon im Fett (im Schweineschmalz 162,75, im Fleisch 41,7) 204,6 Cal, auf das Eiweiß kommen daher 1129 — 204,6 = 924,4 Cal.

924,4 × 0,309 = 285,60
204,6 × 0,127 = 25,98

Das Plus an Kalorienproduktion hätte daher betragen sollen . . . . 311,58 Cal = 27,60 Proz. der Zufuhr.
Wir finden (s. Generaltabelle I) . . . . 177,4 „ = 15,71 „ „ „

Versuch III.

Zufuhr = 120 g Glutenkaseïn = 120 × 5,6 = 672 Cal
Mischung wie im Versuch II . . . . . = 447 „
Total = 1129 Cal

[1]) M. Rubner, a. a. O., S. 18.
[2]) Ders., Ges. d. Energieverbrauches usw., S. 411.
[3]) Direkt kalorimetrisch bestimmt.

Berechnung sonst wie im Versuch II.

Berechnetes Plus an Kalorienproduktion = 310,58 Cal = 27,60 Proz. der Zufuhr
Gefundenes „ „ „ = 171,6 „ = 15,02 „ „ „

Die Berechnung der spezifisch-dynamischen Energie im Versuch IV und V erfolgt später bei deren Besprechung.

Die Berechnung der spezifisch-dynamischen Energie nach Rubner, wie sie in den Versuchen I bis III durchgeführt wurde, führt also zu wesentlich höheren Werten, als sie von uns gefunden wurden. Gegen die Anwendung dieser Berechnungsweise auf unsere Versuche läßt sich aber vielleicht folgendes Bedenken erheben: Es wurden an den drei Versuchstagen jedesmal 22,02 g N eingeführt, im Harn erschienen jedoch wesentlich weniger, im Versuch I z. B. nur 17,972 g. Es ist daher nicht das gesamte Eiweiß an dem betreffenden Tage zur Zersetzung gelangt, wie ja auch bei unserer Versuchsanordnung zu erwarten war. Wir wollen daher einmal versuchen, die Berechnung auf das zersetzte Eiweiß durchzuführen.

Versuch I. Im Harn erschienen am Versuchstage 17,972 g = rund 18 g N. 18 g N entsprechen 18 × 6,25 = 112,5 g Eiweiß. 112,5 g Eiweiß entsprechen einer Einfuhr von 112,5 × 5,6 = 630 Cal. Da nach Rubner[1]) der Fleischextrakt-N rascher wieder im Harn erscheint als der gesamte zugehörige N, so können wir annehmen, daß der gesamte, im Fleisch eingeführte Extraktiv-N in den 18 g Harn-N bereits enthalten ist. Diesem entsprechen 80 Cal, welche nach Rubner ohne spezifisch-dynamische Wirkung bleiben. Es bleiben daher 630 — 80 = 550 Cal.

Nach der Rubnerschen Formel würde sich so ergeben:

550,0 × 0,309 = 170,0 Cal
204,6 × 0,127 = 26,0 „

berechnet = 196,0 Cal Zuwachs der Kalorienproduktion
gefunden = 188,4 „ „ „ „ „

Die kleine Differenz von 7,6 Cal würde noch in die Fehlergrenzen der Methode fallen. Auch ist noch zu berücksichtigen, daß wir bei unserem Versuchshund das Temperaturminimum, bei welchem die chemische Wärmeregulation vollständig ausgeschaltet wird, nicht bestimmt haben. Bei kurzhaarigen Hunden kann aber, wie Herr Geh. Rat Rubner uns persönlich mitzuteilen die Güte hatte, das Minimum etwas über der von uns eingehaltenen Temperatur von 28 bis 30° C liegen.

Daß ein Teil des zugeführten Eiweißes wirklich assimiliert und als Körpereiweiß zurückbehalten worden ist, dafür spricht der Umstand, daß an den den Versuchstagen folgenden Tagen weder ein

[1]) Rubner, Arch. f. Hygiene 51, 29 (1904).

Nachhinken der N-Ausscheidung, noch eine vermehrte Wärmeproduktion zu beobachten ist. Die Berechtigung unserer Berechnungsweise läßt sich allerdings aus den Angaben Rubners nicht mit Sicherheit ableiten. Wir möchten dies betonen, um nicht mißverstanden zu werden. Sie steht jedoch, wie wir glauben, mit den Anschauungen Rubners über die Ursache der spezifisch-dynamischen Wirkung nicht im Widerspruch. Wir müssen wohl annehmen, daß Eiweißansatz erst nach ziemlich tiefgreifender Spaltung des Eiweißes erfolgt. Nach Rubner ist aber nicht der Abbau des Eiweißes an sich, sondern erst dessen völlige Desamidierung die Ursache der Erhöhung des Kraftwechsels.

Wenn wir die Berechnung auf das zersetzte Eiweiß auch für Versuch II und III durchführen, so kommen wir zu den gleichen Resultaten wie in Versuch I, da sich die Höhe der N-Ausscheidung in allen drei Versuchen kaum unterscheidet.

Daß der gefundene Überschuß der Kalorienproduktion an den Fütterungstagen allmählich abnimmt (187,4 Cal bei Fleisch-, 177,4 Cal bei Kaseïn-, 171,6 Cal bei Glutenkaseïnfütterung), könnte in verschiedener Weise gedeutet werden. Einmal wäre anzunehmen, daß ebenso, wie die gesamte Kalorienproduktion in den Nüchternversuchen, bei der hier vorliegenden chronischen Unterernährung abnimmt, auch die spezifisch-dynamische Wirkung an Intensität verliert, oder es könnte sich um eine verschiedene spezifisch-dynamische Wirkung der untersuchten Eiweißkörper handeln; endlich darf nicht vergessen werden, daß die beobachteten Differenzen fast noch in die Fehlergrenzen der Methode fallen. Die größte Differenz beträgt ja nur 16,8 Cal = etwa 1,7 Proz. der Gesamtkalorienproduktion. Soviel können wir wenigstens aus unseren Versuchen schließen, daß, wenn eine Verschiedenheit in der spezifisch-dynamischen Wirkung der untersuchten Eiweißkörper existieren sollte, diese nur gering und unwesentlich sein kann.

C. Die spezifisch-dynamische Wirkung und der physiologische Nutzeffekt des hydrolysierten Kaseïns.

Als spezifisch-dynamische Wirkung des hydrolysierten Kaseïns haben wir eine Steigerung der Wärmeproduktion von 157,5 Cal gefunden (vgl. S. 361).

Bei den Versuchen mit gleichen Mengen anderer Eiweißkörper haben wir eine Steigerung der Wärmeprodukion von 171,6 bis 187,4 Cal beobachtet. Die Steigerung in unserem Falle wäre

also 14 bis 30 Cal = etwa 8 bis 16 Proz. geringer. Wir müssen aber bedenken, daß unser hydrolysiertes Kaseïn einen geringeren Brennwert besaß als unverändertes Eiweiß; wir haben deshalb mit der Nahrung weniger Kalorien zugeführt.

120 g hydrolysiertes Kaseïn haben eine Verbrennungswärme von — 586,8 Cal
120 g unverändertes „ „ „ „ „ „ etwa 672,0 „

Wir haben also beim hydrolysierten Kaseïn etwa 85 Cal = 7,5 Proz. weniger eingeführt als in den Versuchen mit unveränderten Eiweißkörpern. Andererseits ist zu überlegen, daß ja die spezifisch-dynamische Wirkung in unserem Versuch in erster Linie auf das Eiweiß zurückzuführen ist und daß das gleichzeitig gegebene Fett und wahrscheinlich auch das Fleischextrakt demgegenüber die Wärmeproduktion nur um einen verschwindend kleinen Teil vermehren.

Als „Eiweiß“ haben wir zugeführt:

	Beim hydrolysierten Kaseïn	bei den anderen Eiweißkörpern
	587 Cal,	672 Cal
im Fleisch (4,26 × 6,25 = 26,62 g Eiweiß) . . .	150 „	150 „
Total	737 Cal	822 Cal

Die Differenz von 85 Kalorien ist = 11 Proz. der Eiweißzufuhr. Wir haben also bei einer Verminderung der „Eiweiß“zufuhr um 11 Proz. eine Verminderung der spezifischen Energie um 8 bis 16 Proz.

Die spezifisch-dynamische Wirkung des hydrolysierten Kaseïns kann also um höchstens 5 Proz. tiefer liegen als die des unveränderten Kaseïns, eine Differenz, die noch in die Fehlergrenzen der Methode fallen würde. Wir kommen also zu dem Schluß, daß die Summe der abiureten Spaltungsprodukte des Kaseïns annähernd dieselbe spezifisch-dynamische Wirkung ausübt, wie der native Eiweißkörper.

Was folgt nun aus diesem Befunde? Rubner erklärt die spezifisch-dynamische Wirkung durch die Annahme, daß bei der Spaltung des Eiweißes ein N-freier, kohlehydratartiger Komplex entsteht, welcher allein die eigentliche Kraftquelle des Eiweißes darstellen und allein Fett nach dem Grundgesetz der Isodynamie einzusparen imstande sein soll; der N-haltige Rest soll bei der Verbrennung[1]) Wärme liefern, die innerhalb des Organismus in keine

[1]) Lüthje (Therapie der Gegenwart, Mai 1905) schreibt der Spaltung des Eiweißes in einen N-freien und einen N-haltigen Teil allein schon jene die spezifisch-dynamische Energie ausmachende Erhöhung der Wärmeproduktion zu, auch wenn eine Verbrennung des N-haltigen Teiles nicht sofort stattfände. Diese Annahme ist aber in den Ausführungen Rubners nicht enthalten.

andere Kraftform übergeführt werden und auch nicht Fett einsparen kann. Demgegenüber schreibt Zuntz der Darmarbeit den überwiegenden Anteil an der Verdauungsarbeit zu. Die Zuntzsche Ansicht schien durch die Untersuchungen von Cronheim [1]) eine Stütze zu erfahren. Cronheim fand in Versuchen am Menschen nach Eingabe von Somatose nur eine geringe Steigerung der Wärmeproduktion. Seine Versuche sind aber schon deswegen nicht gut zu verwerten, weil die N-Ausscheidung im Kot nicht bestimmt wurde, und daher die Ausnützung des Präparates nicht garantiert ist. Auch waren die Mengen Somatose sehr gering; wurden aber größere Mengen gegeben, so traten Blähungen und weicher Stuhl auf, was wohl auf eine schlechte Ausnützung hindeutet. Falta [2]) hat in Versuchen am Menschen 60 g Somatose, in vier Portionen auf den Tag verteilt, gegeben und dabei am Versuchstage eine N-Ausscheidung im Kot bis zu 7 g beobachtet. Bei Fütterung mit Leim fand Rubner (Gesetze des Energieverbrauchs bei der Ernährung, S. 335 ff.) dieselbe Steigerung der Wärmeproduktion wie bei Eiweißfütterung.

Unser Versuch zeigt jedenfalls, daß die mit der Hydrolyse des Eiweißes verbundene Darmarbeit die Wärmeproduktion nicht in nennenswertem Grade erhöht. Wenn sich nun über die Bedeutung der Resorptionsarbeit auch noch nichts Sicheres aussagen läßt, so werden wir nun doch die Quelle der vermehrten Wärmeproduktion mit größter Wahrscheinlichkeit in jenen Stoffwechselvorgängen suchen, die sich jenseits der Darmwand im intermediären Stoffwechsel abspielen, und die, wie Rubner sagt, zur Spaltung des Eiweißes in einen N-freien und N-haltigen Teil, d. h. zur Desamidierung führen [3]). Damit wären wir allerdings noch nicht zum Verständnis des Wesens der spezifisch-dynamischen Wirkung des Eiweißes gelangt, denn die Frage, warum die bei der Desamidierung sich ent-

---

[1]) W. Cronheim, Beitr. zur Beurteilung der Frage nach dem Nährwerte der Spaltungsprodukte des Eiweißes. Pflügers Arch. **106**.

[2]) Nicht veröffentlicht.

[3]) Die geringe Einbuße, welche das Kaseïn durch die künstliche tryptische Verdauung in seiner spezifisch-dynamischen Wirkung erlitten hat, scheint auch auf einer unter der langen Einwirkung in geringem Umfange erfolgten Desamidierung zu beruhen. Denn das native Kaseïn (Hammarsten) enthält auf 1 g C 0,295 g N; unser hydrolysiertes Präparat enthielt auf 1 g C nur 0,266 g N. Wir haben eingeführt im Versuch mit nativem Kaseïn 23,77 g N (21,91 g Eiweiß N), mit hydrolysiertem Kaseïn 21,01 g N (19,15 g „Eiweiß" N), die Differenz beträgt 2,76 g = 11,6 Proz. (bzw. 12,6 Proz.). Damit stimmt die Differenz von 8 bis 16 Proz. in der spezifisch-dynamischen Wirkung.

faltende Energie nur als Wärme auftreten kann, bleibt nach wie vor ungelöst[1].

Von Interesse ist auch mit Hinsicht auf die Versuche, wie weit die Spaltungsprodukte das Eiweißbedürfnis bestreiten können, die Berechnung des physiologischen Nutzeffektes des hydrolysierten Kaseïns.

Bekanntlich konnte O. Loewi[2]) Hunde mit selbstverdautem Pankreasgewebe längere Zeit im N-Gleichgewicht erhalten, ja sogar geringen N-Ansatz erzielen. Es fällt aber in seinen Versuchen auf, daß der gleiche Hund im Versuch V mit autolysiertem Pankreas weniger an Gewicht zugenommen hat, als im Versuch IV mit gewöhnlicher Nahrung, obschon die Kalorienzufuhr im Pankreasversuch eher höher war. Wir berechnen:

Für Versuch IV:

Fleisch	200 g	= etwa	300 Cal
Stärke	50 „	=	205 „
Schmalz	75 „	=	697 „
		etwa	1200 Cal

Zunahme in drei Tagen von 11,90 kg auf 12,65 kg, pro Tag 250 g.

Für Versuch V:

Pankreas[3])		. . . . . =	198 Cal
Stärke	50 g	. . . =	205 „
Schmalz	100 „	. . . =	930 „
			1333 Cal

Zunahme in vier Tagen von 11,92 kg auf 12,49 kg, pro Tag 140 g.

Einem ähnlichen Verhalten begegnen wir in den meisten Versuchen der späteren Autoren. Man könnte deshalb daran denken, daß der physiologische Nutzeffekt des autolysierten Pankreas geringer ist als der des Fleisches.

---

[1]) Vielleicht könnte man die Ursache für das einseitige Hervortreten der dynamischen Wirkung des Eiweißes zum Teil in den dem zeitlichen Ablauf der Zersetzungen zugrunde liegenden Gesetzen suchen. Kohlehydrate und Fette sind in hohem Grade speicherungsfähig. Soweit ihre Zersetzung dem Wärmehaushalt dient, erfolgt sie fast nur nach Maßgabe des Bedarfes. Diese Art der Wärmeproduktion ist in hohem Grade ökonomisch. Eiweiß hingegen ist, soweit es nicht zu Glykogen umgesetzt werden kann, bei vorwiegendem Eiweißgehalt der Nahrung nur in geringem Grade speicherungsfähig. Es verbrennt sehr rasch (die Erhöhung der Wärmeproduktion ist, wie wir später [Punkt F] sehen werden, nur auf der Höhe der Eiweißzersetzung vorhanden) und liefert dabei im Zustande alleiniger physikalischer Wärmeregulation Wärme im Überschuß. Diese Art der Wärmeproduktion ist sehr unökonomisch. Wenn es gelänge, Eiweiß speicherungsfähig zu machen, so müßte seine spezifisch-dynamische Wirkung kleiner werden oder gar ganz ausfallen. (Siehe später.)

[2]) O. Loewi, Über Eiweißsynthese im Tierkörper. Archiv f. experiment. Pathol. u. Pharmakol. **48**.

[3]) Loewi selbst gibt an, daß seine Substanz 13 Proz. N, pro Gramm Substanz 4,436 Cal lieferte, daraus berechnet sich für 5,8 g N 198 Cal.

Da man also die Möglichkeit einer Differenz zwischen dem physiologischen Nutzeffekt gespaltenen Eiweißes und demjenigen unveränderten Eiweißes in Betracht ziehen muß, so haben wir versucht, ihn in unserem Falle zu berechnen, was in den früheren Versuchen nicht geschehen ist.

Wir definieren als physiologischen Nutzeffekt die Wärmemenge, welche nach Abzug der Verluste in Harn und Kot bei der Verbrennung im Tierkörper erzeugt wird.

Wir haben mit der Nahrung eingeführt:

120 g hydrolysiertes Kaseïn	= 586,8 Cal
Fleischeiweiß (4,26 × 6,25 = 26,6 g Eiweiß) 26,6 × 5,63	= 146,4 „
Fleischextrakt	= 81,1 „
Aus eingeschmolzenem Körpereiweiß	= 66,6 „
	Total 880,9 Cal

Die Abfälle betragen:

Im Kot	68,5 Cal
„ Harn	168,7 „
	Total 237,2 Cal

Um zu berechnen, wieviel von den Abfällen auf das hydrolysierte Kaseïn und wieviel auf die übrigen Bestandteile der Nahrung fällt, können wir die Feststellung Rubners zugrunde legen, daß bei Eiweiß die Abfälle etwa 25 Proz. der Verbrennungswärme betragen[1]). Wir haben dann für Nahrungseiweiß (146,4 Cal) und Körpereiweiß (66,6 Cal) = 213 Cal einen Verlust im Harn und Kot von 51,2 Cal zu rechnen. Schwieriger ist die Berechnung für die Extraktivstoffe. Nehmen wir mit Rubner[2]) an, daß der Extraktivstoff des Fleisches sich an der Wärmeproduktion überhaupt nicht beteiligt, sondern, ohne nutzbare Energie zu liefern, wieder ausgeschieden wird, so hätten wir 81,1 Cal aus Extrakt in den Verlusten zu suchen. Wir hätten dann Gesamtverlust: 237,2 Cal, Extrakt 81,1 Cal, Eiweiß 51,2 Cal, es bleiben Verluste für hydrolysiertes Kaseïn 104,9 Cal. Zugeführt waren im hydrolysierten Kaseïn 586,8 Cal, der Verlust betrüge also somit 18 Proz., der physiologische Nutzeffekt 82 Proz. Nehmen wir dagegen mit Frentzel und Toriyama[3]) an, daß der Nutzeffekt etwa $^2/_3$ betrage, so hätten wir in den Verlusten 81,1 : 3 = 27 Cal in Rechnung zu bringen. Wir erhalten dann: Gesamtverlust 237,2 Cal, Extrakt

---

[1]) Rubner, a. a. O., S. 32.
[2]) Ders., Arch. f. Hygiene 51, 19 (1904).
[3]) Frentzel und Toriyama, Arch. f. Physiol., S. 499 (1901).

27,0 Cal, Eiweiß 51,2 Cal, für hydrolysiertes Kaseïn bleiben 159,0 Cal = 27,1 Proz. Verlust. Der physiologische Nutzeffekt betrüge 72,9 Proz.

Wir können also sagen, daß der physiologische Nutzeffekt des hydrolysierten Kaseïns nicht geringer ist, als der des Fleischeiweißes.

D. Beeinflussung der Eiweißzersetzung durch Kohlehydrate.

Es liegt hier nur ein Versuch vor. Wir möchten daher von vornherein betonen, daß bei der Diskussion der erhaltenen Resultate große Vorsicht geboten ist. Immerhin bietet der Versuch so viel Interessantes, daß wir eine kurze Besprechung doch für berechtigt halten.

Es ist vor allem bemerkenswert, daß sowohl von dem eingeführten Eiweiß als von dem eingeführten Kohlehydrat innerhalb der ersten 24 Stunden nur ein verhältnismäßig geringer Bruchteil in die Zersetzung einbezogen wurde. Von dem eingeführten N erscheinen innerhalb dieser Zeit nur 13,664 g im Harn gegenüber 17,972 g bei gleicher Fleischzufuhr im Versuch I. Die nach Zuntz durchgeführte Berechnung ergibt, daß von dem in der Exspirationsluft erschienenen C nur 39,58 g aus Kohlehydrat stammen, also daß nur 39,58 × 2,5 = 98,95 g Lävulose bei Aufnahme von 180 g zersetzt wurden. Gegen die Zuntzsche Berechnung lassen sich unter den hier vorliegenden Verhältnissen, wie wir bei der Besprechung des zeitlichen Ablaufes der Zersetzungen (Punkt F) noch genauer ausführen werden, allerdings einige Einwände machen. Allein, wenn auch diese Einwände die Genauigkeit der Zuntzschen Berechnung in diesem Falle in Frage stellen, so kann doch der allenfalls vorhandene Fehler unmöglich so groß sein, daß er eine Minderzersetzung von 80 g vortäuschen könnte; auch beweist ja schon der Umstand, daß der R. Q. am Ende der ersten 24 Stunden kaum tiefer liegt als in der eigentlichen „Verdauungsperiode“, daß die Zersetzung der Kohlehydrate noch lange nicht abgeschlossen ist. Zusammenfassend können wir daher sagen, daß innerhalb der ersten 24 Stunden von dem eingeführten Eiweiß nur etwa 62 Proz., von der eingeführten Lävulose kaum mehr als 55 Proz. in die Zersetzung einbezogen wurden. Dieser Befund steht mit unseren bisherigen Vorstellungen über die Schnelligkeit, mit welcher die Kohlehydratzersetzung im Organismus ablaufen sollte, nicht im Einklang. Da wir nur über einen Versuch verfügen, so mag nicht

unerwähnt bleiben, daß Falta und Gigon[1]) in Versuchen, welche unter fast den gleichen Versuchsbedingungen angestellt wurden, auch einen ähnlichen Einfluß der Kohlehydrate auf den Ablauf der Eiweißzersetzung beobachteten, und daß daher auch — ceteris paribus — ein gleich langsamer Ablauf der Kohlehydratverbrennung in diesen Versuchen zu erwarten ist. Auch haben sich in diesen Versuchen Weizenmehl und Lävulose in ihrer Wirkung auf den zeitlichen Ablauf der Eiweißzersetzung als gleich erwiesen, so daß dadurch ein exzeptionelles Verhalten der Lävulose, woran man hätte denken können, unwahrscheinlich wird. Wenn nun tatsächlich die Zersetzung größerer Mengen von Kohlehydraten mehr als 24 Stunden in Anspruch nehmen kann, so ergibt sich daraus, daß eine auf bloßer Bestimmung der CO_2-Produktion beruhende indirekte Kalorimetrie zu unrichtigen Resultaten führen muß, sobald größere Mengen von Kohlehydraten sich am Stoffwechsel beteiligen.

Am meisten Interesse verdient aber wohl das Resultat, welches die Berechnung der spezifisch-dynamischen Energie nach Rubner in diesen Versuchen ergibt. Die Berechnung gestaltet sich folgendermaßen:

Von der eingeführten Nahrung muß das Erbrochene in Abzug gebracht werden. Die Menge desselben betrug trocken 33 g. In demselben waren 1,645 g N. 1 g N der Fleischtrockensubstanz entspricht 8,2 g Fleischtrockensubstanz, 1,645 g N daher = 1,645 × 8,2 = 13,47 g Fleischtrockensubstanz. In dem Erbrochenen sind daher 33 — 13,47 = 19,53 g Lävulose[2]).

100 g frischen Fleisches oder 26,25 g Fleischtrockensubstanz = 150 Cal, 1 g Fleischtrockensubstanz = 5,71 Cal. 13,47 g Fleischtrockensubstanz daher = 76,98 Cal. Diese verteilen sich auf Eiweiß und Fett wie folgt: 100 g frischen Fleisches mit 3,2 Proz. Fett und 3,2 g N = 150 Cal, 1 g N des frischen Fleisches daher $= \frac{140}{3,2} = 43,6$ Cal, 1 g N der entfetteten Fleischtrockensubstanz $= \frac{150 - 3,2 \times 9,3}{3,2} = 37,6$ Cal[3]); 13,47 g Fleischtrockensubstanz mit 1,645 g N = 71,93 Cal, 1,645 g N der entfetteten

[1]) W. Falta u. A. Gigon, Der zeitliche Ablauf der Eiweißzersetzung usw. Diese Beiträge 1907.

[2]) Mit dieser Berechnung stimmt der direkt ermittelte C-Gehalt (13,465 g) des Erbrochenen annähernd überein.

[3]) Nach Rubner, a. a. O., S. 19, berechnen sich im Durchschnitt 35 Cal.

Fleischtrockensubstanz = 1,645 × 37,6 = 61,84 Cal, es bleiben für Fett 15,14 Cal.

	als Fleischeiweiß	als Fett	als Lävulose
Zugeführt wurden	827,4 Cal	204,6 Cal	682,8 Cal
Im Erbrochenen gehen ab . . .	61,8 „	15,1 „	66,7 „
Es bleiben	765,6 Cal	189,5 Cal	616,1 Cal

Total-Kalorienzufuhr = 1571,2 Cal.

Daher 765,6 × 0,309 = 236,6
189,5 × 0,127 = 24,1
616,1 × 0,058 = 35,7

Das Plus an Kalorienproduktion hätte
daher betragen sollen . . . . . 296,4 Cal = 18,9 Proz. der Zufuhr
Wir finden (s. Generaltabelle I) . . 75,5 „ = etwa 5,0 „ „ „

Bei dem geringen Umfang, in welchem die zugeführte Nahrung in diesem Versuch innerhalb der ersten 24 Stunden in die Zersetzung einbezogen worden war, war eine nur annäherungsweise Übereinstimmung zwischen Berechnung und wirklicher Erhöhung des Kraftwechsels natürlich nicht zu erwarten. Wir sind daher in diesem Versuche noch mehr als in den früheren berechtigt, nur den wirklichen Umfang der Eiweiß- und in diesem Falle natürlich auch der Kohlehydratzersetzung zu berücksichtigen. Aber auch dann kommen wir, wie sich zeigen wird, nicht zum Ziele.

Es erschienen 13,664 g N im Harn; diese entsprechen 13,664 × 6,25 × 5,6 = 478,2 Eiweißkalorien. Davon gehen ab 80 Cal aus Fleischextrakt; es bleiben 398,2 Cal.

Nach der Rubnerschen Formel ergibt sich:

Eiweiß-Cal . . . . 398,2 × 0,309 = 123,0
Fett-Cal (zugeführtes Fett) 189,5 × 0,127 = 24,1
Kohlehydrat-Cal (zersetzt) . 376,0 × 0,058 = 21,8
Daher berechnet: 168,9
Gefunden: 75,5

Dasselbe Resultat ergibt eine einfache Überlegung: Im Harn erschienen etwa 9 g N mehr als am vorhergehenden Hungertage, in dem Versuch mit Pferdefleisch allein (Versuch I) erschienen etwa 13 g N mehr als im Hunger. Es wäre daher zu erwarten gewesen, daß die Erhöhung der Wärmeproduktion wenigstens $^9/_{13}$ der im ersten Versuch beobachteten betragen hätte, statt dessen beträgt sie nur 75,5 Cal gegenüber 187,4 Cal, also weniger als die Hälfte.

Zusammenfassend wollen wir bemerken, daß in diesem Versuch die spezifisch-dynamische Wirkung der Nahrungszufuhr auf die Wärmeproduktion viel geringer ist, als

man nach allen vorliegenden Bilanzversuchen hätte erwarten sollen, sie ist wesentlich kleiner, als selbst dem wirklichen Umfang der Eiweißzersetzung allein entspricht. Es ist naheliegend, hier einen bisher noch unbekannten Einfluß der Kohlehydrate zu vermuten[1]), um so mehr, als gerade die Kohlehydrate infolge der unzureichenden Methodik bisher im Stoffwechsel noch nicht exakt untersucht werden konnten. Wir möchten aber nochmals zu bedenken geben, daß uns nur ein einziger Versuch mit einem bestimmten Kohlehydrat (Lävulose) zur Verfügung steht, und daß erst weitere Versuche eine sichere Schlußfolgerung gestatten werden.

E. Die Wasserverdampfung in den Fütterungsversuchen.

Die Wasserverdampfung steigt an den Fütterungstagen sehr erheblich an und zwar stärker als die Gesamtkalorienproduktion. Dementsprechend finden wir auch höhere Zahlen für den Anteil der Wasserverdampfung an der Wärmeabgabe als in den Nüchternversuchen. Unter sich weisen die Zahlen in den Fütterungsversuchen mit Eiweißkörpern eine gute Übereinstimmung auf (30,7 — 32,2 — 32,2; s. Generaltabelle I). Das gleiche gilt auch für den Versuch mit Fleisch und Lävulose; auch hier beträgt die Zahl 32. Zweifellos liegt hier eine Gesetzmäßigkeit zugrunde. Endlich finden wir auch im Versuch mit hydrolysiertem Kaseïn ein Ansteigen der Wasserdampfabgabe und zwar zu fast ebenso hohen absoluten und relativen Werten wie im Versuch I mit Fleisch.

F. Der zeitliche Ablauf der Zersetzung.

Zuerst soll der Ablauf der Ausscheidungen in Kürze besprochen werden. Soweit derselbe in 12stündigen Perioden ermittelt wurde, ist er in Generaltabelle III übersichtlich zusammengestellt.

Die N-Ausscheidung. In den Versuchen I bis III zeigen sich im Ablauf der N-Ausscheidung folgende Differenzen: Im Versuch I mit Fleisch fällt die N-Ausscheidung am raschesten wieder ab. Immerhin zeigt sich in der zweiten 12stündigen Periode noch eine deutliche Erhöhung, nach 24 Stunden ist der Hungerwert wieder

---

[1]) Dieser Einfluß könnte damit im Zusammenhang stehen, daß Eiweißansatz durch keinen anderen Nährstoff mehr begünstigt wird, als durch Kohlehydrat. Während das Eiweiß sonst rasch im Organismus verpufft, ist es jetzt speicherungsfähig, ähnlich wie Fett und Kohlehydrate, und die entsprechend dem allmählichen Abbau viel langsamer erfolgende Wärmeproduktion wird dadurch ökonomischer.

erreicht. Im Versuch II mit Kaseïn ist die Erhöhung der N-Ausscheidung in der zweiten 12stündigen Periode noch deutlicher als im Versuch I; auch findet sich hier noch in der dritten 12stündigen Periode ein etwas höherer Wert. Im Versuch III mit Glutenkaseïn ist der Ablauf der N-Ausscheidung noch viel deutlicher verlangsamt. Wir finden hier in der zweiten 12stündigen Periode noch 7,175 g N gegenüber 4,896 g N im Versuch mit Fleisch.

Der Verlauf der N-Ausscheidung nach Fleischfütterung wurde noch in einem Kontrollversuch in kleineren, den Respirationsperioden entsprechenden Perioden bei einem anderen Tiere von gleichem Körpergewicht untersucht[1]). Es wurden dabei dieselben Versuchsbedingungen eingehalten. Berechnen wir aus den in diesem Versuch erhaltenen Werten die stündliche N-Ausscheidung, so ergibt sich folgender Ablauf:

1. Tag (Hunger) im Mittel	. . . .	stündlich	0,218 g N
2. Tag (688 g Fleisch)	7 bis 11 Uhr	„	0,850 „ „
	11 „ 3 „	„	1,140 „ „
	3 „ 7 „	„	1,280 „ „
	7 „ 1 „	„	0,420 „ „
	1 „ 7 „	„	0,390 „ „
3. Tag (Hunger) im Mittel	. . . .	„	0,187 „ „

Die N-Ausscheidung steigt also rasch an, erreicht in der 8. bis 12. Stunde ihr Maximum. Dann weist die Kurve eine Knickung auf, wie sie Gruber[2]) beschrieben hat, und zieht dann durch weitere 12 Stunden einen Schweif nach sich.

In den Versuchen II und III ist wohl ein ähnlicher Verlauf zu erwarten; nur liegt der Knickungspunkt höher über dem Hungerniveau, beim Glutenkaseïn wieder höher als beim Kaseïn.

Im Versuch IV mit hydrolysiertem Kaseïn sind nur 21 g N gegenüber 22 bis 24 g N in den Versuchen I bis III eingeführt worden. Auch hier wurde ein Kontrollversuch unter ähnlichen Bedingungen an demselben Tier durchgeführt. Aus diesem ergibt sich folgendes:

Es wurden hier ausgeschieden:

In $6\frac{1}{2}$ Stunden 8,16 g N (im Versuch I mit Fleisch in 8 Stunden 7,94 g N).
In weiteren 6 Stunden 3,64 g N (im Versuch I mit Fleisch in weiteren 4 Stunden 5,13 g N).

In dem Kontrollversuch wurden also in $12\frac{1}{2}$ Stunden 11,80 g N ausgeschieden, was mit der im Hauptversuch in 12 Stunden aus-

[1]) Vgl. die Bemerkung 1 in Versuch I, S. 12.
[2]) Gruber, Zeitschr. f. Biologie 42 (Jubelband).

geschiedenen N-Menge (10,598 g) gut übereinstimmt. Der Vergleich mit Versuch I ergibt, daß in dem Versuch mit hydrolysiertem Kaseïn in $6\frac{1}{2}$ Stunden schon mehr N ausgeschieden würde, als im Fleischversuch in 8 Stunden, obwohl weniger N eingeführt worden war. Die N-Ausscheidung ist also zweifellos im Anfang stark beschleunigt. Hingegen ist sie später verzögert, da in der zweiten 12stündigen Periode ein sehr hoher Wert (7,240) sich findet, und auch in der dritten 12stündigen Periode noch nicht völlig Hungerzersetzung herrscht.

Endlich finden wir im Versuch V mit Fleisch und Lävulose die N-Ausscheidung hochgradig verlangsamt, wie ein Blick auf die Generaltabelle III ergibt. Das Maximum fällt hier erst auf die zweite 12stündige Periode. In der dritten 12stündigen Periode finden wir noch den Wert 3,640 g.

C-Ausscheidung im Harn. Diese fällt im Versuch I mit Fleisch rascher ab als in den Versuchen mit reinen Eiweißkörpern und hydrolysiertem Kaseïn. Sie hat im Versuch I schon nach 24 Stunden den Nüchternwert erreicht, in den Versuchen II bis IV scheint hingegen noch in der dritten 12stündigen Periode eine Vermehrung vorhanden zu sein. Sehr deutlich ist die Verlangsamung im Versuch IV mit hydrolysiertem Kaseïn: 7,240 g in der zweiten, 5,945 g in der dritten 12stündigen Periode.

Quotient C/N im Harn. Im Hungerharn finden wir durchschnittlich etwas höhere Werte, als sie Rubner[1]) und Frank und Trommsdorff[2]) gefunden haben. Die Versuche I bis III zeigen ferner die von Frank und Trommsdorff beschriebene Erniedrigung des Quotienten C/N nach Eiweißzufuhr; der tiefste Wert wird beim Glutenkaseïn erreicht: 0,555. Daß die Werte nicht so tief heruntergehen wie bei Frank und Trommsdorff, hat wohl seinen Grund darin, daß wir nicht so große Eiweißmengen verfütterten. Das Niedrigerwerden des Quotienten C/N nach Eiweißfütterung sagt aus, daß der Harnstoff nun gegenüber den anderen N-haltigen Bestandteilen im Harn einseitig hervortritt. Von besonderem Interesse ist aber der Versuch IV mit hydrolysiertem Kaseïn. Hier finden wir in der ersten 12stündigen Periode für den Quotienten C/N den Wert 0,685, der tiefer liegt als die Zahlen des Hungerzustandes, aber nicht so tief wie nach Fleischnahrung; in der zweiten 12stündigen Periode ist dann im Gegensatz zu

---

[1]) Rubner, a. a. O.

[2]) O. Frank und R. Trommsdorff, Der Ablauf der Eiweißzersetzung nach Fütterung mit abundanten Eiweißmengen. Zeitschr. f. Biologie 43.

den Versuchen mit Eiweißkörpern der Nüchternwert wieder erreicht, obschon die N-Ausscheidung noch beträchtlich erhöht ist.

Im Versuch V findet sich in der ersten 12stündigen Periode ein verhältnismäßig hoher Wert (0,975). Dieser erklärt sich aber aus der Anwesenheit von Lävulose im Harn, da Trommer und Seliwanoff positiv waren und sich geringe Linksdrehung fand. Im Harn der zweiten 12stündigen Periode fielen die Reaktionen auf Lävulose schon negativ aus.

P_2O_5-Ausscheidung. Im Versuch I mit Fleisch fällt das Maximum der P_2O_5-Ausscheidung in die ersten 12 Stunden. Dies ist nicht zu verwundern, da nach Rubner[1]) die Phosphate des Fleisches sehr rasch wieder ausgeschieden werden. Bei Verwendung ausgewaschenen Fleisches soll nach Rubner das Maximum der P_2O_5-Ausscheidung hinter das der N-Ausscheidung fallen. Ein direkter Vergleich mit Versuch II und III ist nicht möglich, da wir den Phosphorgehalt des Fleisches nicht bestimmt haben. Es läßt sich nur so viel sagen, daß sich in den Versuchen mit reinen Eiweißkörpern in den zweiten 12stündigen Perioden noch verhältnismäßig hohe Werte finden.

Besonders interessant sind wieder die Verhältnisse im Versuch IV mit hydrolysiertem Kaseïn. Hier liegt das Maximum in der ersten 12stündigen Periode = 2,470 g. Ein ähnlicher Wert wurde auch in dem Kontrollversuch erhalten, nämlich 2,62 g in $12^1/_2$ Stunden, davon 2,38 g in den ersten $6^1/_2$ Stunden. Diese Werte sind um so auffälliger, als sich im hydrolysierten Kaseïn überhaupt nur 2,65 Proz. Asche fand. Eine Erklärung hierfür können wir nicht geben; vielleicht sind hier Verschiebungen in den durch Nieren und Darm zur Ausscheidung gelangenden P_2O_5-Mengen im Spiele.

H-Ausscheidung in der Harntrockensubstanz. Diese zeigt von der C-Ausscheidung keine wesentlichen Differenzen.

NH_3-Ausscheidung. Diese steigt nach Fleischfütterung an. Es zeigt sich dabei eine Differenz zwischen N und NH_3-Ausscheidung, indem diese viel früher zur Norm zurückkehrt als jene. Die NH_3-Ausscheidung weist vielmehr einen Parallelismus mit dem gesteigerten Gaswechsel auf. Besonders interessant ist wieder Versuch IV mit hydrolysiertem Kaseïn. Hier steigt die NH_3-Ausscheidung in den ersten 12 Stunden auf den ungewöhnlichen Wert von 2,125 und erhält sich dann auf noch recht beträchtlichen Werten bis nach mindestens 36 Stunden (wahrscheinlich nicht

[1]) Rubner, Gesetze des Energieverbrauchs usw., S. 368.

länger, siehe den Lävuloseversuch). Der Harn reagierte dabei besonders in den ersten 12 Stunden stark sauer. Ähnliche Zahlen gab der Kontrollversuch: 1,672 g NH_3 in den ersten 12 Stunden, davon 1,143 g in den ersten $6^1/_2$ Stunden! Der Quotient $\frac{NH_3 . N}{N}$ steigt dabei natürlich stark an. Wahrscheinlich dürfte die stark saure Beschaffenheit des verfütterten Verdauungsgemisches die Ursache für das Ansteigen der NH_3-Ausscheidung sein[1]). Vielleicht ist das Ammoniak direkt an Aminosäuren im Harn gebunden. Der Harn gab weder Aceton- noch Acetessigsäure-Reaktion. Auf β-Oxybuttersäure haben wir nicht gefahndet.

Im Versuch V mit Lävulose ist die Steigerung der NH_3-Ausscheidung stark verlangsamt.

Die CO_2-Ausscheidung und O_2-Aufnahme und der respiratorische Quotient. Das Maximum der stündlichen CO_2-Ausscheidung und O_2-Aufnahme (vgl. Generaltabelle II) liegt im Versuch I mit Fleisch am höchsten. Beide Kurven fallen dann rasch ab und sind schon nach 12 Stunden zum Nüchternwert zurückgekehrt. Aus Tabelle II (erster Versuch, zweiter Tag) geht hervor, daß das Maximum der CO_2-Produktion und O_2-Aufnahme früher erreicht wird als das Maximum der N-Ausscheidung. Das Maximum der CO_2-Abgabe und O_2-Aufnahme liegt schon in der Periode 8 bis 11 Uhr, das der N-Ausscheidung erst zwischen 3 bis 7 Uhr[2]). In den Versuchen II und III mit reinen Eiweißkörpern zeigen die Werte auch in den zweiten 12stündigen Perioden noch geringe Erhöhungen über den durchschnittlichen Nüchternwert, im Versuch mit Glutenkaseïn sogar über den Maximalnüchternwert. Der respiratorische Quotient steigt in allen Versuchen deutlich an. Die Steigerung ist schon nach 12 Stunden abgeklungen. In dem Versuch mit Glutenkaseïn liegt der höchste respiratorische Quotient erst zwischen 11 bis 3 Uhr, auch ist der respiratorische Quotient zwischen 3 und 7 Uhr noch ziemlich hoch. Vergleichen wir nun die CO_2-Kurve und die Werte für den respiratorischen Quotienten mit der N-Kurve, so ergibt sich, daß die N-Ausscheidung noch wesentlich gesteigert ist zu einer Zeit, wo der respiratorische Gaswechsel nahezu oder völlig (wie

---

[1]) Vgl. auch die Untersuchungen von Schittenhelm und Katzenstein (Über Beziehungen des Ammoniaks zum gesamten Stickstoff im Urin. Zeitschr. f. experim. Pathol. und Therap. 1906), welche nach Einfuhr von Aminosäuren vermehrte NH_3-Ausscheidung fanden.

[2]) Die Divergenz zwischen CO_2- und N-Kurven ist schon von Frank und Trommsdorff (a. a. O.) beschrieben worden.

beim Fleisch) den Nüchternwert erreicht hat. Zur Erklärung dieser Tatsache könnte man annehmen, daß die eigentliche Verbrennung des Eiweißes in unseren Versuchen schon in den ersten 12 Stunden beendet ist, und daß es nur längert dauert, bis der aus dem Eiweiß stammende Stickstoff völlig im Harn wieder erscheint. Eine so starke Verlangsamung der Harnstoffausscheidung ist wohl nicht gut anzunehmen, da wir wissen, daß in die Zirkulation gebrachter Harnstoff sofort wieder eliminiert wird. Hingegen ist vorderhand die Annahme wohl nicht zu widerlegen, daß die Harnstoffsynthese mit der Desamidierung nicht gleichen Schritt hielte. Eine andere Erklärung könnte so formuliert werden, daß zuerst die Verbrennung von Komplexen überwöge, welche einen kleineren O_2-Bedarf haben als diejenigen, welche hauptsächlich später zur Verbrennung gelangen. Nach der Vorstellung Rubners wären erstere die bei der Verbrennung des Eiweißes entstehenden kohlehydratartigen Komplexe. Diese Annahme würde auf einen stufenweisen Abbau des Eiweißmoleküls hindeuten. Die zweite Annahme schließt natürlich die erste nicht völlig aus. Ob und in welcher Weise hier ein Zusammenhang mit dem Ablauf der Resorption besteht, ist noch völlig dunkel.

Ob wir nun mehr zu der einen oder der anderen Annahme hinneigen, die oben beschriebene Divergenz zwischen CO_2-Abgabe und O_2-Aufnahme einerseits und zwischen N-Ausscheidung andererseits zeigt uns, daß die indirekte Kalorimetrie Rubners und die Zuntzsche Berechnung nicht mehr exakt ist, sobald wir sie auf kleinere Perioden anwenden. Die Beziehungen zwischen N-Ausscheidung und „Eiweißkohlenstoff“ in der Exspirationsluft werden dann unsicher und damit auch die ganze Kalorienberechnung. Wir glauben daher, daß der von Frank und Trommsdorff[1]) aufgestellte Satz, daß das Maximum der Kalorienproduktion früher fällt als das der N-Ausscheidung, noch nicht scharf bewiesen ist.

Wir haben, dieser Überlegung folgend, nur in Versuch I und V die Berechnung auf 12stündige Perioden durchgeführt. In Versuch I finden wir nach unserer Berechnung in der zweiten 12-stündigen Periode des Fütterungstages schon eine der Hungerzersetzung entsprechende Kalorienproduktion. Vielleicht sind die hier der Berechnungsweise anhaftenden Fehler nicht so groß, um die sich hieraus ergebende Annahme, daß die spezifisch-dynamische Wirkung in diesem Versuche schon nach 12 Stunden abgeklungen

[1]) Frank und Trommsdorff, a. a. O., S. 279.

ist, völlig illusorisch zu machen. Für den Versuch V mit Lävulose ist diese Berechnung — quod erat demonstrandum — aber sicher falsch. Denn wir finden hier in der zweiten 12 stündigen Periode des Fütterungstages einen Wert für die Kalorienproduktion, der tiefer ist als die Hungerzersetzung. Es ist sogar wahrscheinlich, daß bei Beteiligung großer Mengen von Kohlehydraten am Stoffwechsel selbst die Berechnung 24 stündiger Perioden unsicher wird, und daß vielleicht die von uns gefundene geringe Erhöhung des Kraftwechsels nicht den tatsächlichen Verhältnissen entspricht. Hier kann nur die direkte Kalorimetrie sicheren Aufschluß geben.

Unser verehrter Chef, Herr Professor His, hat uns für die Ausführung dieser Untersuchungen die Mittel des Laboratoriums in liberalster Weise zur Verfügung gestellt. Wir erlauben uns, an dieser Stelle hierfür unsern ergebensten und herzlichsten Dank auszusprechen.

Basel, im September 1906.

XXIV.

Bestimmung der nicht dialysablen Stoffe des Harns.

Von **Kumoji Sasaki** (Kanasawa).

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

1.

Jeder Harn enthält eine gewisse Menge adialysabler Stoffe, doch ist deren Natur nur unvollkommen aufgeklärt. Die erste genauere Untersuchung derselben wurde von P. Eliacheff[1]) unter Leitung von Gautier und Laborde ausgeführt. P. Eliacheff engte größere Mengen eiweißfreien (d. h. kein Eiweiß im klinischen Sinne enthaltenden) Harns im Vakuum ein, dialysierte den Rückstand unter antiseptischen Maßnahmen (Zusatz von Blausäure) sehr anhaltend und brachte den nicht dialysablen Anteil durch Einengen im Vakuum zur Trockne. 42 Liter Harn von normalen oder an äußeren Affektionen leidenden Individuen ergaben bei dieser Behandlung 5,8 g trockenen adialysablen Rückstand, entsprechend 0,138 g pro Liter und 0,193 g pro 24 Stunden.

Das Gemenge der adialysablen Stoffe wurde als schokoladefarbiges amorphes Pulver erhalten, das sehr löslich in Wasser, wenig löslich in Alkohol und Äther, hygroskopisch, von deutlich saurer Reaktion war. Die Lösung reduzierte Goldchlorid, Platinchlorid, Quecksilberchlorid und Silbernitrat, nicht aber alkalische Kupferoxydlösung und gab mit Gerbsäure einen Niederschlag. Sie enthielt nur Spuren von Asche und besaß die Zusammensetzung:

C = 60,75 Proz.,	H = 9,37 Proz.,	N = 10,94 Proz.,
O = 12,54 „	P = 3,00 „	S = 3,40 „

In ähnlicher Weise stellte Eliacheff den adialysablen Rückstand aus dem Harn zweier tuberkulöser Individuen vor und nach Injektion von Tuberkulin dar. Vor der Einspritzung enthielt der

---

[1]) Mémoires de la société de Biologie [9] 3 (1891).

Harn 0,130 g adialysable Substanz pro 24 Stunden. Nach der Einspritzung traten Fieberbewegungen ein. Der Fieberharn enthielt 0,234 g pro 24 Stunden und die Analyse ergab für den nicht dialysablen Rückstand:

C = 55,59 Proz., H = 8,26 Proz., N = 13,88 Proz.,
O = 15,87 „ P = 3,00 „ S = 3,40 „

Der in den fieberfreien Zwischenräumen gesammelte Harn enthielt in 24 Stunden 0,143 g der Substanz, die übrigens die Zusammensetzung der aus Normalharn dargestellten aufwies.

Eliacheff untersuchte ferner die Giftigkeit des nicht dialysablen Anteiles. Sowohl der Rückstand aus normalem, wie aus Fieberharn erwies sich als giftig, nur war die Giftigkeit des ersteren weit geringer. 0,025 g des Produktes aus normalem Harn töteten z. B. bei intravenöser Beibringung ein Kaninchen von 2 kg 200 g, während vom Produkt aus Fieberharn schon 0,010 g hinreichten und überdies viel rascher wirkten. Die Vergiftungssymptome waren: Zittern, Konvulsionen, Somnolenz, Mydriase, Asphyxie. Der Leichenbefund ergab neben Lungenhyperämie wiederholt subpleurale Ekchymosen und Füllung des diastolischen Herzens mit ungeronnenem Blut. Auch bei subkutaner Einverleibung an sich selbst beobachtete Eliacheff namentlich nach Beibringung des Fieberproduktes leichte Störungen: etwas Fieber, anhaltenden Kopfschmerz, Pulsbeschleunigung und lange andauernde Appetitlosigkeit. Eliacheff weist darauf hin, daß die Retention dieser Harnbestandteile bei Nierenerkrankungen notwendig zu Vergiftungserscheinungen führen müsse.

Welche Harnbestandteile an diesem adialysablen Rückstande beteiligt sein dürften, läßt sich zum Teil der überaus gründlichen Arbeit C. A. H. Mörners „Über die Proteïnstoffe und die eiweißfällenden Substanzen des normalen Menschenharns“ [1]) entnehmen. Danach enthält normaler Harn regelmäßig 1. eine kleine Menge eines Mucoids, das vorwiegend an der Bildung der Nubecula beteiligt ist, 2. eine Nukleïnsäure, 3. Chondroitinschwefelsäure, 4. geringe Mengen echtes Eiweiß, und zwar anscheinend Serumalbumin. Da diese Substanzen, unter denen die Chondroitinschwefelsäure überwiegt, sämtlich nicht dialysabel sind, so ist ihre Gegenwart in dem adialysablen Produkt zu erwarten. Damit stimmen Beobachtungen aus jüngster Zeit von E. Salkowski [2]), der den durch ab-

[1]) Skandinav. Arch. f. Physiol. 6, 332.
[2]) Berl. klin. Wochenschr. 42, 1582 ff. (1905).

soluten Alkohol fällbaren Teil der Harnsubstanzen untersuchte und darin nach Dialyse gegen strömendes Wasser hauptsächlich einen stickstoffhaltigen Bestandteil nachweisen konnte, der sehr stark die Molisch sche Reaktion gab und nach Spalten mit Salzsäure Fehlingsche Lösung reduzierte. Es darf wohl vermutet werden, daß hier neben anderen Stoffen Chondroitinschwefelsäure vorlag.

Neben den eben genannten, von Mörner als normale Harnbestandteile nachgewiesenen Stoffen kommen bei dem adialysablen Rückstande etwa noch die im Harn vorkommenden kieselsauren Salze und die Fermente in Betracht. Die Gewichtsmenge dieser Bestandteile ist sicher verschwindend gering. Die Farbstoffe des normalen Menschenharns treten bei ausgiebiger Dialyse so gut wie vollständig ins Außenwasser über. Die Vermutung, daß die Oxyproteïnsäure nicht dialysabel ist, erwies sich, wie mir Herr Prof. Hofmeister mitteilt, beim Versuch als unzutreffend. Ein nach Bondzyński und Gottlieb[1]) dargestelltes Präparat von oxyproteïnsaurem Baryum (mit 34,5 Proz. Ba und 8,5 Proz. N) dialysierte bei Anwendung von Schilfschläuchen relativ leicht. Ob die der Gruppe der Oxyproteïnsäure nahestehenden Verbindungen: die Uroprotsäure[2]), die Alloxy- und Antoxyproteïnsäure[3]), die Uroferrinsäure[4]) [vielleicht gehört auch Héris Säure[5]) hierher], weniger leicht durch Pflanzenmembranen gehen, habe ich nicht untersucht.

2.

Der Umstand, daß die Chondroitinschwefelsäure bei der Amyloidbildung anscheinend eine wichtige Rolle spielt, daß ferner bei anderen Erkrankungen, die mit tiefgreifenden Stoffwechselstörungen einhergehen, so bei akuter gelber Leberatrophie und akuter Phosphorvergiftung, der Übertritt von albumosenähnlichen Substanzen in den Harn beobachtet ist, und auch die oben mitgeteilte einmalige Beobachtung Eliacheffs über Vermehrung der adialysablen Stoffe im Fieber ließen es wünschenswert erscheinen, ein bequem ausführbares Verfahren zu deren Bestimmung auszuarbeiten. Es war dabei auch an den Übertritt von unbekannten spezifischen kolloidalen Produkten des krankhaften Stoffwechsels,

[1]) Zentralbl. f. d. med. Wiss. 1897, S. 577.
[2]) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 40, 29.
[3]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 35, 2959 Zeitschr. f. physiol. Chem. 46, 83.
[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 251.
[5]) Ebenda 46, 1.

sowie von Toxinen und Fermenten, in den Harn zu denken und zu berücksichtigen, daß die quantitative Verfolgung der Gesamtausscheidung solcher Stoffe vielleicht eine Möglichkeit bietet, auf derartige sich sonst der Untersuchung entziehende Harnveränderungen aufmerksam zu werden.

Von diesen Gesichtspunkten ausgehend empfahl mir Herr Prof. Hofmeister die nachstehend mitgeteilten Versuche auszuführen.

Die Bestimmung der nicht dialysablen Stoffe im Harn scheitert bei Verwendung von Pergamentpapier zum Teil an der relativ geringen Leistungsfähigkeit dieses Materials, zum Teil an der Schwierigkeit, den Dialysatoren eine solche Gestalt zu geben, daß der Versuch auch mit geringen Flüssigkeitsmengen ausgeführt werden kann, und daß der Diffusionsvorgang möglichst rasch an der ganzen Fläche des in dünner Schicht verteilten Harns stattfindet. Ich benutzte die im hiesigen Institut viel verwendeten, den Bakteriologen wohlbekannten Schilfschläuche, deren Vorzüge bei Dialysierversuchen bereits von P. Phillipson[1]) hervorgehoben worden sind.

Solche Schilfschläuche sind, wenn unverletzt, völlig porenfrei und lassen dialysierende Stoffe überaus rasch durchtreten. Ein Schlauch von 15 bis 20 cm Länge wird an einem Ende fest zugeschnürt, in das andere Ende wird ein trichterförmig gestaltetes Glasrohr eingebunden. Da die Schläuche nur einige Cubikcentimeter fassen, empfiehlt es sich, wenn man größere Zahlenwerte erhalten will, zwei oder drei durch kurze mit Nuten versehene Glasröhren zu verbinden.

Hat man den Schlauch erst durch Füllen mit Wasser und Stehenlassen auf seine absolute Intaktheit geprüft, so füllt man ihn mit dem zu untersuchenden Harn, hängt ihn mit dem trichterförmigen Ansatz in einen mit passenden Öffnungen versehenen Holzrahmen und taucht ihn in einen mit destilliertem Wasser gefüllten Zylinder, dessen Inhalt sich selbsttätig rasch erneuert. Bei passender Wahl der Gefäße können gleichzeitig mehrere (z. B. 6 oder 9) Schläuche in den Rahmen eingesetzt werden. Sehr wichtig ist es, die ganze Zeit über durch einen kleinen Motor den Rahmen und so auch die Dialysierschläuche durch kurze Stöße erschüttern zu lassen, da die Dialyse dadurch außerordentlich beschleunigt wird.

Die leicht dialysierenden Salze gelingt es so sehr rasch zu entfernen. Hält man die Dialyse für beendet, so entleert man durch Anschneiden des unteren Schlauchendes mit einer feinen Schere den Inhalt in ein untergehaltenes gewogenes Schälchen, spült mit destilliertem Wasser durch das trichterförmige Ansatzrohr nach, bringt die Flüssigkeit zur Trockne und wägt den Rückstand.

---

[1]) Diese Beiträge 1, 80.

Für den vorliegenden Fall war es von Wichtigkeit, den Zeitpunkt zu ermitteln, in dem bei Anwendung von Harn auch die schwerer dialysablen Stoffe herausdiffundiert sind. Es wurde daher in einer Serie von Bestimmungen festgestellt, wann der Trockenrückstand des Harns bei weiterer Dialyse nicht mehr abnimmt.

Vorheriges Einengen des Harns empfiehlt sich nicht, weil der so konzentrierte Harn in dem Dialysator rasch wieder so viel Wasser aufnimmt, daß der Vorteil des Einengens nahezu ganz verloren geht und überdies die Gefahr besteht, daß der eingefüllte Harn über das Bereich der dialysierenden Schlauchwand in den Ansatztrichter aufsteigt oder geradezu überläuft. Auch wird die Dauer der Dialyse nicht abgekürzt.

Zersetzung des Harns während der Dialyse habe ich nicht beobachtet. Die rasche Entfernung der dialysablen Stoffe verhindert offenbar die Entwickelung der Fäulniserreger. Es konnte daher von dem Zusatz von Antisepticis Abstand genommen werden.

Bei der großen Zartheit der Schilfschläuche ist eine sehr vorsichtige Handhabung derselben geboten. Trotzdem gelingt es nicht leicht, einen einzelnen Schlauch mehr als zwei- oder dreimal in Verwendung zu ziehen. Um nicht Bestimmungen zu verlieren, habe ich stets drei gleichartige Dialysierversuche nebeneinander angesetzt.

Ich lasse als vorläufiges Beispiel einige von mir ausgeführte Versuche folgen, wobei bemerkt sei, daß sich das Verfahren seitdem im hiesigen Laboratorium bei zunehmender Erfahrung als zuverlässig bewährt hat.

Vers.-Nr.	Vorbereitung des Harns	Verwendet ccm	Dauer der Dialyse Stunden	Trockenrückstand mg				Berechnet auf 1 Liter des urspr. Harns g
				A	B	C	Mittel	
I.	—	5	12	0,0031	0,0033	0,0042	0,0035	
		5	36	0,0033	0,0034	—	0,0034	0,68
II.	auf $^1/_{10}$ eingedampft	3	14	0,0258	0,0222	—	0,0240	
		3	24	0,0070	0,0071	—	0,0071	
		3	39	0,0062	0,0067	—	0,0065	0,218
III.	— (Fieberharn)	10	19	0,0380	0,0353	—	0,0367	
		10	29	0,0288	0,0247	—	0,0268	
		10	43	0,0219	0,0191	—	0,0205	2,050

In Versuch I und II war die Entfernung der dialysablen Stoffe in 24 bis 36 Stunden erreicht, ebenso in anderen nicht mitgeteilten Versuchen. Das Verhalten des an adialysablen Stoffen sehr reichen Fieberharns weist aber darauf hin, daß unter Umständen eine längere Dialyse erforderlich ist. Darüber werden

weitere Erfahrungen zu entscheiden haben, ebenso wie auch über den mittleren Gehalt des Harns an adialysablen Stoffen, wenngleich schon aus den von Eliacheff und mir gefundenen Werten sich für die Norm ein mittlerer Gehalt von einigen Decigrammen pro Liter ergibt.

3.

Nach dem eingangs Ausgeführten ist zu erwarten, daß für die Norm der adialysable Rückstand vorwiegend aus Chondroitinschwefelsäure- und Nucleïnsäureverbindungen, sowie aus Eiweiß bestehen dürfte. Um darüber ein Urteil zu gewinnen, habe ich eine etwas größere Menge dieses Rückstandes dargestellt und seine Eigenschaften untersucht.

9,5 Liter normalen, von gesunden jungen Männern stammenden Harns wurden im Vakuum, unter Beseitigung des Auskristallisierten, bei einer 40° nicht übersteigenden Temperatur auf 250 ccm eingeengt. Der sirupöse Rückstand kam in eine Anzahl Schläuche aus Pergamentpapier und wurde darin gegen strömendes Leitungswasser unter stetem Schütteln bis zum Verschwinden der Chlorreaktion dialysieren gelassen. Der wenig gefärbte, aber sehr stark verdünnte Schlauchinhalt wurde neuerdings im Vakuum eingeengt. Die schließlich erhaltene Lösung enthielt erhebliche Mengen Asche, vor allem Calciumsalze (da das Leitungswasser solche enthält), war fällbar durch Jodquecksilberkalium und Phosphorwolframsäure, gab keine Biuret-, Tryptophan- und Millonsche Probe, aber starke Molischsche und Xanthoproteïnreaktion.

Die Prüfung auf Phosphorsäure mit molybdänsaurem Ammon gab in der Kälte selbst bei 24 stündigem Stehen keine Gelbfärbung, nur einen weißen Niederschlag. Nach vorherigem Abrauchen mit konzentrierter Salpetersäure trat auf Zusatz des Molybdats sofort starke Phosphorsäurereaktion ein. Die mit Baryumchlorid versetzte und klar filtrierte Lösung trübte sich bei anhaltendem Kochen mit konzentrierter Salzsäure unter Abscheidung von Baryumsulfat. Nach Spaltung mit konzentrierter Salzsäure reduzierte die Lösung Fehlingsche Flüssigkeit. Die wässerige Lösung, mit Essigsäure versetzt, gab mit einer ebenso angesäuerten Serumeiweißlösung deutliche Fällung.

Dies Verhalten entspricht der Anwesenheit von Chondroitinschwefelsäure und Nucleïnsäure. Hingegen kann der Nachweis von Eiweiß nicht als geliefert angesehen werden. Vielleicht waren die vorhandenen Spuren als unlösliches Chondroitinsulfat oder Nucleïnat zugleich mit dem Harnmucoid bei dem wiederholten Filtrieren während der Darstellung entfernt worden[1]).

[1]) Inwieweit die von Abderhalden und Pregl (Zeitschr. f. physiol. Chem. **46**, 19) untersuchte kolloidale Substanz aus Harn, die bei der Säurespaltung eine Anzahl Aminosäuren lieferte, den hier in Frage kommenden Kolloiden entspricht, ist auf Grund der von den Autoren gemachten Angaben nicht zu beurteilen.

4.

In betreff der Giftwirkung der adialysablen Bestandteile des Menschenharns weichen meine Erfahrungen von jenen von Eliacheff ab. Ich habe eine ganze Reihe von Präparaten dargestellt und dabei auf die Abwesenheit erheblicher Mengen der bei intravenöser Applikation recht giftigen Kationen K, Ca, NH_4 besonderes Gewicht gelegt. In zwei Darstellungen wurde der im Vakuum eingeengte Harn vorher in der Kälte mit Kalkhydrat und Chlorcalcium von Phosphorsäure und dem größten Teil der Schwefelsäure befreit, nach dem Neutralisieren dialysiert, aus dem Rückstande das Calcium mit Natriumcarbonat entfernt; in anderen Versuchen wurde er durch Alkohol in einen darin löslichen und unlöslichen Anteil getrennt, jeder für sich dialysiert und nach entsprechender Einengung (und Entfernung des vorhandenen Calciums) zur Injektion verwendet. In den ausgeführten etwa 40 Versuchen erwiesen sich die Präparate, in 0,8 proz. Kochsalzlösung verteilt und Kaninchen in einer Dosis von je 0,5 g intravenös eingeflößt, als unwirksam, so weit dies daraus zu entnehmen ist, daß in der nächsten Zeit nach der Beibringung bis zu einigen Tagen keine Erscheinungen auftraten, die man mit Sicherheit hätte als Giftwirkung auffassen können. Größere Dosen, namentlich solche über 1 g, veranlaßten Krämpfe und Coma. Ein Blutdruckversuch ergab merkliche Blutdrucksenkung.

Daß die chondroitinschwefelsauren Salze keine besonders toxische Wirkung haben, ist bereits mehrfach gezeigt. Insofern stehen meine Erfahrungen mit dem Bekannten im Einklang. Die von Eliacheff ausgeführten Versuche weisen allerdings auf eine viel höhere Toxizität hin. Es liegt der Verdacht nahe, daß hier die als Antiseptikum zugesetzte Blausäure in irgend einer Art, vielleicht durch Bildung von toxischen Verbindungen, beteiligt war, doch liegen auch andere Möglichkeiten vor, so daß ich auf eine Aufklärung dieses Widerspruches vorderhand verzichte.

Erwähnt sei, daß auch oxyproteïnsaures Natron (aus dem Baryt- und dem Kupfersalz dargestellt) in Dosen von 0,6 und 0,9 g ohne erkennbare physiologische Wirkung war.

XXV.

Quantitative Untersuchungen über die Ausscheidung der Chondroitinschwefelsäure.

Von Ch. Pons (Gent).

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Wie K. A. H. Mörner[1]) gezeigt hat, enthält der Harn normalerweise Chondroitinschwefelsäure, und zwar übertrifft sie hier ihrer Menge nach die anderen ebenfalls im normalen Harn vorkommenden Kolloidstoffe, das Harnmucoid, die Nucleïnsäure und das Albumin. Diese Tatsache weist ebenso, wie das konstante Vorkommen der Chondroitinschwefelsäure in bestimmten Geweben, im Knorpel, den Arterienwandungen[2]), anscheinend auch in der Niere[3]) darauf hin, daß diese kolloidale Säure bestimmten physiologischen Funktionen dient. Für ihre Bedeutung bei pathologischen Prozessen spricht ihr Vorkommen in amyloidentarteten Organen. Die quantitative Verfolgung ihres Auftretens im Tierkörper verspricht danach in mehrfacher Richtung interessante Aufschlüsse. Einen ersten Schritt zu solchen Untersuchungen sollen die nachstehenden Versuche bilden, in denen ich es auf Anregung von Herrn Prof. Hofmeister unternahm, die Ausscheidung der Chondroitinschwefelsäure durch den Harn quantitativ zu verfolgen.

Für die Ausarbeitung eines Verfahrens zur Bestimmung der Chondroitinschwefelsäure waren zwei Eigenschaften derselben ausschlaggebend: 1. ihre Unfähigkeit durch Membranen zu gehen, 2. ihre chemische Natur, die sie als Esterschwefelsäure befähigt, bei Einwirkung von konzentrierten Mineralsäuren, neben einem Kohlehydrat Schwefelsäure abzuspalten.

---

[1]) K. A. H. Mörner, Skandinav. Arch. f. Physiol. 6, 332.
[2]) C. Th. Mörner, Zeitschr. f. physiol. Chem. 20, 357.
[3]) K. A. H. Mörner, a. a. O.

Unter der Voraussetzung, daß der Harn keine andere adialysable Esterschwefelsäure enthält, war damit der Weg der quantitativen Bestimmung gegeben. Es war nur notwendig, die etwa vorhandenen dialysablen Esterschwefelsäuren zu beseitigen und die Menge der dann noch bei Säureeinwirkung abspaltbaren Schwefelsäure zu ermitteln.

Von der Unfähigkeit der Chondroitinschwefelsäure, durch Membranen zu gehen, habe ich mich in wiederholten Versuchen überzeugt. Nicht bloß Pergamentpapier, sondern auch die viel zarteren und durchlässigeren Schilfmembranen sind für sie und ihre Salze völlig undurchlässig. Bringt man eine Lösung von chondroitinschwefelsaurem Natron in einen Schilfschlauch und läßt gegen destilliertes Wasser dialysieren, so tritt keine Spur davon in das Außenwasser über. Zum Nachweise diente mir, wie auch sonst, 1. die Abspaltung von Schwefelsäure beim Kochen mit konzentrierter Salzsäure und beim Kochen mit Barythydrat, 2. die Fällung von Eiweiß und Leim in essigsaurer Lösung. Das Resultat war beim eingeengten Dialysat stets negativ.

Daß die im Harn bekanntermaßen auftretenden Esterschwefelsäuren der Phenole und des Indoxyls dialysabel sein würden, war von vornherein anzunehmen. Ich habe mich überdies durch spezielle Versuche davon überzeugt.

Einem Kaninchen von 1340 g wurde eine nicht tödliche Dosis (0,3 g) reines kristallisiertes Phenol, in 10 ccm Wasser gelöst, unter die Haut gespritzt. Der danach gelassene Harn enthielt gepaarte Schwefelsäure und gab bei Destillation mit Schwefelsäure ein Destillat, das mit Bromwasser reichlich Tribromphenol lieferte. Nach dreitägiger Dialyse gab das eingeengte Dialysat keine Spur von Phenol mehr.

Ebenso gab an Indoxylschwefelsäure reicher Harn vom Menschen nach 3 tägigem Dialysieren und nachträglichem Einengen auf ein geringes Volum bei Prüfung nach Obermayer keine Indicanreaktion mehr.

Man darf danach annehmen, daß auch die verwandten Esterschwefelsäuren, wie Kresol- und Skatoxylschwefelsäure dialysabel sind und keine Störung bei der Bestimmung der Chondroitinschwefelsäure bedingen.

Es konnte noch der Einwand gemacht werden, daß die Substanzen aus der Gruppe der Oxyproteïnsäure (Oxyproteïnsäure, Alloxyproteïnsäure, Antoxyproteïnsäure, Uroferrinsäure), die sämtlich Schwefel enthalten, einen Fehler in der Bestimmung der Chondroitinschwefelsäure bedingen. Da diese Substanzen zum Teil recht ungenügend charakterisiert sind und überdies eine Verunreinigung dieser Verbindungen mit Chondroitinschwefelsäure für einige der angegebenen Darstellungsmethoden nicht ausgeschlossen

ist, so ist es sehr schwierig, diesen Einwand mit voller Sicherheit zu entkräften. Doch ist wenigstens für die Oxyproteïnsäure im hiesigen Laboratorium die Dialysierbarkeit mit Sicherheit nachgewiesen[1]).

Um zu ermitteln, wie lange siedende Salzsäure einwirken muß, um aus Chondroitinschwefelsäure maximale Schwefelsäureabspaltung zu erzielen, habe ich ein aus Knorpeln hergestelltes Präparat verschieden lange mit konzentrierter siedender Salzsäure kochen lassen und die Menge der abgespaltenen Schwefelsäure bestimmt.

10 ccm einer Lösung von nach Mörner[2]) dargestellter Chondroitinschwefelsäure wurden mit 10 ccm einer 5 proz. Baryumchloridlösung und 20 ccm konzentrierter Salzsäure eine Stunde lang unter dem Rückflußkühler im Sieden erhalten. Der nach Verdünnen und Stehenlassen erhaltene Niederschlag von Baryumsulfat wog nach dem Auswaschen und Glühen 0,0104 g. Ein ganz ähnlich ausgeführter Versuch mit zweistündigem Sieden ergab 0,0108 g $BaSO_4$.

Danach genügt einstündige Säurewirkung, um maximale Schwefelsäureabspaltung zu erzielen. Ob dabei die Chondroitinschwefelsäure allen Schwefel als Schwefelsäure abgibt, ist nicht entschieden. Das von mir untersuchte Präparat gab nach Oxydation mit Salpetersäure oder Natriumperoxyd etwas mehr Baryumsulfat (0,0123 und 0,0143 g). Danach wären durch einfache Säurespaltung nur etwa $^3/_4$ des vorhandenen Schwefels als Schwefelsäure erhalten worden. Da jedoch sehr schwer vollständige Gewähr für die Reinheit eines Präparates von Chondroitinschwefelsäure zu erhalten ist, so möchte ich es vorderhand dahingestellt sein lassen, ob die von mir im nachstehenden mitgeteilten Werte nur einen Maximalwert von etwa 75 Proz. oder einen der Theorie näher kommenden darstellen.

Bei Untersuchung des Harns bin ich in folgender Weise vorgegangen. Der möglichst frische Harn wurde filtriert, eventuell unter Toluol aufbewahrt. Eine abgemessene Menge, 200 bis 500 ccm, wurde drei bis fünf Tage in Dialysierschläuchen gegen fließendes Leitungswasser dialysieren gelassen, dann mit 10 ccm gesättigten Barytwassers versetzt, 24 Stunden damit stehen gelassen und durch ein Barytfilter unter öfterem Zurückgießen filtriert, bis das Filtrat völlig klar war. Die Fällung mit Baryt war notwendig, um die aus dem Leitungswasser stammende Schwefelsäure zu entfernen. Das gesamte Filtrat wurde in einem geräumigen Kolben (meist

---

[1]) Vgl. K. Sasaki, Diese Beiträge 9, 388.
[2]) C. Th. Mörner, Zeitschr. f. physiol. Chem. 20, 358.

benutzte ich Kjeldahlkolben aus Jenaer Glas) mit 10 ccm Baryumchlorid und 10 ccm konzentrierter Salzsäure bis zur Hälfte eingekocht, nochmals mit 10 ccm konzentrierter Salzsäure versetzt und bis auf 26 bis 30 ccm eingedampft. Das ausgeschiedene Baryumsulfat wurde in üblicher Weise auf ein aschefreies Filter gebracht, chlorfrei gewaschen und nach dem Glühen gewogen.

Hierzu sei folgendes bemerkt. Es ist in manchen Fällen schwierig, beim Filtrieren des mit Barytwasser versetzten dialysierten Harns selbst bei wiederholtem Zurückgießen ein klares Filtrat zu erhalten. Ich bin dann durch nochmaligen Barytzusatz und Einleiten von Kohlensäure zum Ziele gelangt. Erhitzen der von Barythydrat alkalisch reagierenden Lösung ist wegen der Zersetzlichkeit der Chondroitinschwefelsäure zu vermeiden.

Nachstehend lasse ich eine Anzahl an Menschen-, Hunde- und Kaninchenharn ausgeführter Bestimmungen folgen.

Menschenharn von normalen Individuen bei gewöhnlicher Kost.

	24 stündige Harnmenge ccm	Menge des dialysierten Harns ccm	Dauer der Dialyse Tage	Erhalten $BaSO_4$ g	$BaSO_4$ pro 24 Stunden g	Schwefel der Chondroitinschwefelsäure in 24 Stunden g
40jähr. Mann .	—	500	2	0,0112	0,0336[1]	0,0046
" " .	—	500	3	0,0123	0,0369[1]	0,0051
28jähr. Mann .	—	500	4	0,0128	0,0384[1]	0,0053
30jähr. Mann .	—	200	5	0,0040	0,0300[1]	0,0041
29jähr. Frau .	1335	500	4	0,0125	0,0332	0,0046
30jähr. Frau .	1400	250	6	0,0070	0,0392	0,0054

Die pro Tag in Form von Chondroitinschwefelsäure ausgeschiedene Schwefelmenge beträgt etwa 0,005 g und scheint danach sehr geringen Schwankungen zu unterliegen. Da die Menge des täglich ausgeschiedenen Schwefels gegen 1 g beträgt, so stellt sie davon nur einen geringen Bruchteil, etwa $^1/_2$ Proz., dar. Nimmt man den Gehalt der Chondroitinschwefelsäure an Schwefel mit Schmiedeberg zu 5,7 Proz. an, so ergibt sich die tägliche Ausscheidung derselben zu 0,08 bis 0,09 g.

---

[1]) Die tägliche Harnmenge wurde nicht gemessen. Obige Werte berechnen sich bei Zugrundelegung einer Tagesmenge von 1500 ccm.

Hundeharn.

Die Versuchstiere erhielten täglich 250 g Hundekuchen und 1 Liter Wasser.

Gewicht der Versuchstiere kg	24stünd. Harnmenge ccm	Davon dialysiert ccm	Dauer der Dialyse Tage	Aus Dialysierrückstand erhalten $BaSO_4$ g	pro 24 Stunden g	Schwefel der ausgeschied. Chondroitinschwefelsäure in 24 Stunden g
4	519	400	5	0,0054	0,0069	0,0009
8,5	1200	300	5	0,0034	0,0130	0,0018
8,5	1200	200	3	0,0028	0,0168	0,0024

Kaninchenharn.

Es kam der vereinigte Harn zweier auf Grünfutter gesetzter Tiere von 1340 und 1450 g Gewicht zur Verwendung.

Harnmenge in 24 Stunden ccm	Dialysierte Harnmenge ccm	Dauer der Dialyse Tage	Darin $BaSO_4$ g	$BaSO_4$ pro 24 Stunden für ein Kaninchen g	Schwefel der ausgeschied. Chondroitinschwefelsäure in 24 Stunden g
466	400	3	0,0098	0,0057	0,0008
750	300	4	0,0036	0,0045	0,0006
350	300	6	0,0090	0,0052	0,0007
700	300	5	0,0056	0,0065	0,0009

Im Verhältnis zum Körpergewicht ist die Ausscheidung der Chondroitinschwefelsäure beim Kaninchen größer als beim Hunde und hier größer als beim Menschen.

Ob die Größe der Ausscheidung von der Menge und Art der Nahrung abhängig ist, bleibt noch zu untersuchen. Vorderhand liegt es am nächsten, die ausgeschiedene Chondroitinschwefelsäure als ein Produkt des intermediären Stoffwechsels aufzufassen, das nicht der Ernährung dient, sondern als Abfallprodukt bestimmter Gewebe erst ins Blut, dann in den Harn gelangt.

Mit der eben geäußerten Vorstellung steht die Tatsache im Einklang, daß intravenös beigebrachte Chondroitinschwefelsäure zum Teil durch die Niere ausgeschieden wird.

Über die Ausscheidung in den Tierkörper eingeführter Chondroitinschwefelsäure liegen Beobachtungen von Oddi[1]) vor.

[1]) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 33, 376.

Oddi brachte Hunden und Kaninchen chondroitinschwefelsaures Natron intravenös bei und fand, daß etwas davon durch den Harn entleert wurde. Auch bei Fütterungsversuchen wurde Chondroitinschwefelsäure im Harn und im Kot wiedergefunden.

Mit Hilfe der ausgearbeiteten Methode war es leicht festzustellen, ob und in welcher Menge eingeführte Chondroitinschwefelsäure in den Harn übergeht.

Die von mir benutzte Chondroitinschwefelsäure war mit kleinen Abweichungen, über die später gelegentlich berichtet werden soll, nach dem Verfahren von C. Th. Mörner dargestellt.

Den beiden Kaninchen, deren normale Ausscheidung an Chondroitinschwefelsäure ich oben ermittelt hatte, wurde je 1 g chondroitinschwefelsaures Natrium, in 10 ccm Wasser gelöst, allmählich durch die Ohrvene beigebracht. Sie zeigten danach keine Verminderung der Freßlust, noch sonst welche Erscheinungen. Die Menge des in den nächsten 24 Stunden entleerten Harns betrug 550 ccm. 150 ccm davon wurden durch 5 Tage der Dialyse unterworfen. Der Rückstand, wie oben verarbeitet, gab 0,1290 g $BaSO_4$, woraus sich für die Tagesmenge für ein Kaninchen 0,2365 g ergibt, etwa das 40fache der Normalzahl. Der Harn gab, direkt geprüft, alle Reaktionen der Chondroitinschwefelsäure.

Acht Tage später erhielt in einem zweiten Versuch das 1340 g schwere Kaninchen 3 g chondroitinschwefelsaures Natrium in 20 ccm Wasser intravenös injiziert. Die Harnmenge der nächsten 24 Stunden betrug 260 ccm. Davon wurden 100 ccm fünf Tage lang gegen strömendes Wasser dialysiert. Der adialysable Rückstand lieferte 0,1918 g $BaSO_4$ aus gepaarter Schwefelsäure, somit für die Tagesmenge 0,3946 g, also 70 mal mehr als der Normalharn.

Fällte man den Rückstand der Dialyse mit zwei Volumen 95 proz. Alkohols, so erhielt man einen klumpigen weißen Niederschlag, der sich als nahezu reines chondroitinschwefelsaures Natron erwies.

Die Ausscheidung der Chondroitinschwefelsäure dauerte tagelang. Noch am dritten Tage konnte im Harn direkt mit Leimlösung (s. unten) Chondroitinschwefelsäure nachgewiesen werden.

Dieses Verhalten entspricht jenem körperfremder Stoffe, bzw. der Auswurfsstoffe des Organismus. Nährstoffe, wie Zucker, Albumosen, Aminosäuren, treten, wenn in großer Menge ins Blut injiziert, zwar auch zunächst in den Harn über, allein diese Ausscheidung dauert nur kurze Zeit. Nährstoffe, die vom Blut einmal an die Organe abgegeben wurden, kehren nicht mehr zum Blute zurück, so daß, abgesehen von dem sofort in die Nieren gelangenden Anteil, ein weiterer Verlust durch den Harn nicht eintritt. Körperfremde Stoffe und Auswurfstoffe aber verteilen sich zwar vom Blute aus, soweit die Niere nicht zu ihrer sofortigen Entfernung ausreicht, über die gesamten Organe, kehren aber, sobald

das Blut daran durch Abgabe an den Harn verarmt, wieder allmählich zum Blute zurück, so daß die Ausscheidung durch die Niere in abnehmendem Maße tage-, ja wochenlang anhält. Daß auch die Chondroitinschwefelsäure dieses Verhalten zeigt, spricht ebenso wie ihr konstantes Auftreten im Harn dafür, daß sie nicht als ein Nährstoff im gewöhnlichen Sinne aufgefaßt werden darf.

Zum gleichen Schlusse berechtigt das Verhalten der per os eingeführten Chondroitinschwefelsäure bei Kaninchen.

Zwei Kaninchen, 2500 und 2700 g schwer, die mit Möhren und Hafer gefüttert wurden, erhielten am 19. Oktober zusammen 1,7 g chondroitinschwefelsaures Natron in 20 ccm Wasser mit der Schlundsonde; sodann am 26. Oktober neuerdings 2,5 g in 30 ccm Wasser. In dem vereinigten Harn beider Tiere wurde der Gehalt an nicht dialysierbarer Esterschwefelsäure bestimmt.

Oktober	Harnmenge (beider Tiere) ccm	Dialysiert ccm	Dauer der Dialyse Tage	$BaSO_4$ im Dialysierrückstand g	$BaSO_4$ pro 24 Stunden für ein Kaninchen g	Schwefel der ausgeschied. Chondroitinschwefelsäure in 24 Stunden g
	215	215	5	0,0175	0,0088	0,0012
	235	235	5	0,0161	0,0081	0,0011
19.	350	350	5	0,0558	0,0279	0,0038
20.	210	210	5	0,0176	0,0088	0,0012
26.	455	255	5	0,0308	0,0274	0,0038

Die Darreichung der Chondroitinschwefelsäure per os führt sonach zu einer sehr deutlichen, wenn auch geringen Mehrausscheidung.

Danach kommt im Darm ein Teil der eingeführten Chondroitinschwefelsäure sicher zur Resorption. Ob dieser Teil ganz im Harn zur Ausscheidung kommt oder im Stoffwechsel zum Teil zerstört wird, bleibt noch festzustellen. Doch möchte ich den Umfang der Zerstörung nicht allzuhoch anschlagen. Die Untersuchung des Kotes nach Zufuhr von Chondroitinschwefelsäure ergab nämlich beim Kaninchen einen sehr erheblichen Gehalt daran und, wie ich nebenbei bemerken will, ebenso beim Hund. —

Bei diesen Versuchen habe ich Gelegenheit gehabt, mannigfache Erfahrungen über den Nachweis der Chondroitinschwefelsäure im Harn zu sammeln. Als sehr charakteristisch und recht empfindlich möchte ich die von Mörner benutzte Leimprobe in

folgender Ausführung empfehlen. Der Harn wird filtriert, dialysiert — was bei Verwendung von Schilfschläuchen nur einige Stunden in Anspruch nimmt —, der Dialysenrückstand, falls er nicht ganz klar ist, mit Kieselgur geschüttelt und bis zur völligen Klarheit filtriert. Etwa 5 bis 10 ccm vom Filtrat füllt man in Probiergläschen, versetzt mit fünf Tropfen 25 proz. Essigsäure, schüttelt um und läßt stehen. Oft entsteht schon jetzt beim Stehen eine zarte Trübung (Harnmucoid, chondroitinschwefelsaures und nucleïnsaures Eiweiß). Nimmt die Trübung nicht mehr zu, so teilt man die Probe und versetzt die eine Hälfte mit zwei bis drei Tropfen einer klaren, ebenfalls mit Essigsäure angesäuerten Gelatinelösung, die 0,20 g reine Gelatine und 10 ccm konzentrierte Essigsäure auf 200 ccm Wasser enthält; zeigt die Trübung eine deutliche Zunahme, so darf auf Anwesenheit von Chondroitinschwefelsäure geschlossen werden. Zur Sicherung der Diagnose ist der Nachweis von abspaltbarer Schwefelsäure und von Kohlehydrat in dem nicht dialysablen Anteil heranzuziehen.

XXVI.

Der Gehalt des Frauenharns an adialysablen Stoffen unter normalen und pathologischen Verhältnissen.

Von Dr. **M. Savarè** (Mailand).

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

1.

In einer der vorstehenden Arbeiten[1]) hat K. Sasaki über Versuche berichtet, in denen die Menge der nicht dialysablen Bestandteile des Harns nach einem bequemen Verfahren bestimmt wurde. Sasaki fand für den normalen Harn Werte von 0,218 und 0,68 g im Liter. Diese Zahlen entsprechen annähernd jenen, die schon vor längerer Zeit P. Eliacheff[2]) für den normalen Harn mit Hilfe einer allerdings umständlicheren Methode ermittelt hatte. Ferner konnte Sasaki, ebenso wie schon früher Eliacheff, eine Steigerung im Gehalt des Fieberharns an solchen Stoffen nachweisen. Der aus diesen wenigen Erfahrungen sich ergebende Hinweis, daß der Gehalt des Harns an adialysablen Stoffen von Stoffwechselstörungen maßgebend beeinflußt wird, ließ es wünschenswert erscheinen, einmal die Grenzen schärfer zu bestimmen, innerhalb deren sich die normale Ausscheidungsgröße dieser Stoffe bewegt, sodann deren Verhalten unter pathologischen Verhältnissen näher zu verfolgen. Über Vorschlag von Herrn Prof. Hofmeister bin ich dieser Frage näher getreten und habe dabei speziell mit Rücksicht auf die noch immer ungelöste Frage nach dem Wesen der Eklampsie zunächst den Harn von gesunden, nichtschwangeren und schwangeren Frauen, sodann von Nephritischen und Eklamptischen untersucht. Für die Erlaubnis, dabei das Material der Straßburger Frauenklinik benutzen zu dürfen, bin ich Herrn Prof. Fehling zu bestem Danke verpflichtet. Von den vier Eklampsieharnen, die in gut konserviertem

[1]) Diese Beiträge 9, 386.

[2]) Mémoires de la société de Biologie 9, III (1891).

Zustande zur Untersuchung kamen, sind mir zwei von Herrn Dr. Biancardi in Mailand in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt worden, die beiden anderen habe ich in der geburtshilflichen Klinik in Florenz untersucht.

Zur Bestimmung der adialysablen Stoffe benutzte ich das von K. Sasaki ausgearbeitete Verfahren der „Schütteldialyse" unter Verwendung von Schilfschläuchen. Um genügende Mengen Harn im einzelnen Falle dialysieren zu können, wurden durch Aneinanderreihung mehrerer Schläuche Dialysatoren von etwa 40 cm Länge hergestellt. Wegen der großen Verletzlichkeit der Schlauchmembran wurden von jedem Harn mindestens drei Proben zur Dialyse gebracht. Die mitgeteilten Zahlen stellen das Mittel von zwei oder drei Einzelbestimmungen dar, die voneinander meist nur um Zehntel Milligramme abwichen. Die Dauer der Dialyse betrug 24 Stunden, welche Zeit sich in Vorversuchen als völlig ausreichend erwiesen hatte.

2. Adialysabler Harnrückstand von gesunden, nichtschwangeren und schwangeren Frauen.

Nebenstehend gebe ich tabellarisch die für den Harn von gesunden Frauen ermittelten Werte.

Die in der Tabelle angeführten Normalzahlen geben zum erstenmal eine Vorstellung von den Grenzwerten, innerhalb deren sich der Gehalt an adialysablen Stoffen unter normalen Verhältnissen bewegt. Es handelt sich dabei nur um Frauenharn, doch dürfte, nach den von Eliacheff und Sasaki ermittelten Werten zu schließen, Männerharn sehr nahestehende Zahlen liefern. Leider mußte ich aus äußeren Gründen auf die Feststellung der Tagesmenge des Harns verzichten, und es bedarf meine Untersuchung nach dieser Richtung einer Ergänzung. Vorläufig kann als oberer Grenzwert bei mittlerem Verhalten der Versuchspersonen der Gehalt von 0,70 g pro Liter Harn angesehen werden.

Wie aus der Tabelle der Harne von Hochschwangeren hervorgeht, wird auch hier dieser Grenzwert nur ausnahmsweise merklich überschritten (Nr. 9, 12, 19). Demgemäß liegt das Mittel auch nicht viel höher als bei den Normalharnen (0,60 gegen 0,44) und es erniedrigt sich noch erheblich, wenn man die drei angeführten, über die Normalgrenze hinausgehenden Harne 9, 12 und 19 ausscheidet. Dann ist der Durchschnitt 0,54 g pro Liter, was der Normalzahl recht nahe kommt. Jedenfalls ist man berechtigt, zu sagen, daß der Harn der Schwangeren sich in betreff des Gehalts

Gesunde nichtschwangere Frauen				Gesunde Frauen im 9. Monat der Schwangerschaft			
Nr.	Dialysierter Harn ccm	Adialysabler Rückstand darin g	Adialysabler Rückstand im Liter g	Nr.	Dialysierter Harn ccm	Adialysabler Rückstand darin g	Adialysabler Rückstand im Liter g
1	30	0,0130	0,43	1	30	0,0170	0,57
2	30	0,0210	0,70	2	30	0,0220	0,73
3	15	0,0081	0,54	3	15	0,0100	0,67
4	15	0,0080	0,53	4	30	0,0200	0,67
5	15	0,0110	0,73	5	30	0,0200	0,67
6	15	0,0054	0,36	6	15	0,0045	0,30
7	15	0,0060	0,40	7	10	0,0035	0,35
8	15	0,0068	0,44	8	15	0,0047	0,31
9	15	0,0037	0,24	9	15	0,0172	1,15
10	15	0,0042	0,28	10	10	0,0042	0,42
11	10	0,0039	0,39	11	15	0,0100	0,67
12	15	0,0056	0,37	12	15	0,0154	1,03
13	30	0,0122	0,41	13	15	0,0086	0,57
14	30	0,0157	0,52	14	15	0,0098	0,65
15	15	0,0053	0,35	15	15	0,0078	0,52
16	10	0,0038	0,38	16	15	0,0068	0,44
17	10	0,0036	0,36	17	15	0,0061	0,41
18	10	0,0047	0,41	18	15	0,0087	0,58
19	10	0,0054	0,54	19	15	0,0160	1,06
20	10	0,0049	0,49	20	10	0,0059	0,59
			Mittel 0,44	21	30	0,0167	0,56
				22	15	0,0088	0,59
				23	10	0,0054	0,54
				24	10	0,0045	0,45
				25	10	0,0061	0,61
							Mittel 0,60

an adialysablen Stoffen in der Regel nicht von jenem nichtschwangerer Frauen unterscheidet.

In betreff der Deutung der angeführten hohen Ausnahmewerte möchte ich noch mit dem Urteil zurückhalten. Im Hinblick auf die Häufigkeit der Albuminurie bei Schwangeren sei ausdrücklich bemerkt, daß nur Harne zur Untersuchung kamen, die sich bei vorgängiger Prüfung mittels Kochprobe als völlig eiweißfrei erwiesen hatten.

Die chemischen Eigenschaften des adialysablen Rückstandes sind von K. Sasaki in der oben angeführten Arbeit kurz angegeben worden. Meine Erfahrungen stimmen mit seinen im wesentlichen überein. Der Rückstand wurde als graubraune hygroskopische Masse von saurer Reaktion erhalten, die auf dem Platinblech mit Karamelgeruch verbrannte und sehr wenig Rückstand ließ.

Sie enthielt Schwefel und Phosphor, war löslich in Wasser, namentlich rasch in alkalisch gemachtem, nur zum geringen Teil löslich in Alkohol, Äther, Chloroform. Sie gab keine Biuret-, und eine kaum angedeutete Millonsche und Adamkiewiczsche Probe. Wohl aber fällte sie in mit Essigsäure angesäuerter Lösung Serumalbumin, was auf die Anwesenheit von Chondroitinschwefelsäure[1]), möglicherweise auch auf Spuren von Nukleïnsäure zu beziehen ist.

Eine auffällige Verschiedenheit zwischen dem adialysablen Rückstand des Harns von schwangeren und nichtschwangeren Frauen war nicht gegeben. Nur war die auf Chondroitinschwefelsäure zu beziehende Reaktion auf Eiweiß- oder Leimlösung beim Harn nichtschwangerer Frauen stärker ausgesprochen. Soweit also eine Vermehrung des adialysablen Rückstandes bei Schwangeren anzunehmen ist, kann sie nicht auf Zunahme der Chondroitinschwefelsäure bezogen werden.

Der naheliegende Gedanke, daß das geringe Plus an adialysabler Substanz bei Schwangeren auf deren größerer Nahrungsaufnahme beruht, veranlaßte mich, einige Versuche an Hunden im Hungerzustande und nach Fütterung anzustellen.

	Harnmenge ccm	Dialysiert ccm	Darin adialysabler Rückstand g	Adialysabler Rückstand im Liter g	Adialysabler Rückstand pro Tag g
Hund bei normal. Futter	500	15	0,0098	0,65	0,33
„ nach 3 Tag. Hunger	400	15	0,0128	0,85	0,34
„ bei normal. Futter	550	15	0,0104	0,69	0,38
„ nach 3 Tag. Hunger	500	15	0,0162	1,08	0,54

Danach scheint die Nahrungsaufnahme keinen oder nur einen geringen Einfluß auf die Ausscheidung der adialysablen Stoffe zu besitzen, vor allem nicht im Sinne einer Erhöhung bei vermehrter Zufuhr.

3. Harn bei Nephritis.

Bevor ich an die Untersuchung des Harns von Eklamptischen ging, war es wünschenswert, analoge Versuche am Harn bei Nephritis auszuführen, teils um festzustellen, inwieweit die Albuminurie an sich eine Änderung in der Ausscheidung der adialysablen Substanzen bewirkt, teils um den Fehler zu ermitteln, der in solchen Fällen durch die notwendige vorgängige Enteiweißung des Harns veranlaßt werden kann. Dabei kam nur der Harn von nichtschwangeren Frauen zur Untersuchung.

[1]) Vgl. Pons, in der vorstehenden Arbeit, S. 399.

Zur möglichst vollständigen Enteiweißung des Harns versetzte ich eine gemessene Menge davon bei saurer Reaktion mit 2 Volumen 95 proz. Alkohols und ließ sie dann einige Stunden auf dem siedenden Wasserbade stehen. Das Filtrat vom Koagulum nebst Waschwasser wurde im Vakuum bei niederer Temperatur auf ein kleines Volum gebracht und dann wie gewöhnlich der Dialyse unterworfen.

Versuchs-Nr.	Form der Nephritis	Tagesmenge des Harns ccm	Dialysierte Menge ccm	Darin adialysabler Rückstand g	Adialysabler Rückstand	
					pro Liter g	pro 24 Std. g
1	Nephr. acuta	840	15	0,0128	0,65	0,71
2	„ „	—	15	0,0103	0,68	—
3	„ subacuta	1470	30	0,0252	0,84	1,23
4	„ chronica	1800	10	0,0083	0,83	1,49
5	„ „	2400	10	0,0078	0,78	1,87
6	„ „ mit diff. Oedem	1790	10	0,0067	0,67	1,20
7	Nephr. chronica mit Ascites	2700	10	0,0058	0,58	1,57
				Mittel	0,75	

Die chemische Beschaffenheit des Dialysenrückstandes zeigte keine besondere Abweichung von dem gewöhnlichen Verhalten.

Vergleicht man die hier pro Liter Harn ermittelten Rückstandswerte (Mittel = 0,75) mit den früher bei normalen Frauen gefundenen (Mittel = 0,44), so ergibt sich eine deutliche Steigerung, deren Bedeutung zunächst nicht festzustellen ist. Für die Untersuchungen am Harn Eklamptischer läßt sich aber aus dieser Zahl wenigstens so viel entnehmen, daß der bei meinem Verfahren (etwa durch unvollkommene Koagulation des Eiweißes oder infolge von Verdauung desselben durch im Harn vorhandene proteolytische Fermente usw.) in maximo entstehende Fehler nicht über 0,3 g pro Liter Harn anzuschlagen ist.

4. Harn bei Eklampsie.

Meine Untersuchungen über den Harn von Eklamptischen beziehen sich vorerst nur auf vier Fälle. Ihr Ergebnis scheint mir aber bemerkenswert genug, um es schon jetzt mitzuteilen. Die Fälle, um die es sich handelte, sind nach den klinischen Notizen folgende:

1. Erstgebärende. Zwei leichte Anfälle während der Wehen, kein Anfall post partum. 1,4 Proz. Eiweiß. Genesung.
2. Drittgebärende. Wenige Anfälle vor und während des Geburtsaktes. 0,4 Proz. Eiweiß. Genesung.
3. Erstgebärende. Anfälle während der Schwangerschaft (9. Monat) und während der Geburt. 2,2 Proz. Eiweiß. Genesung.
4. Erstgebärende. Erster Anfall einige Stunden post partum, dem sechs weitere, zum Teil schwere folgen. Im Harn nur eine nicht bestimmbare Spur Eiweiß. Genesung.

Der nachgewiesene Eiweißgehalt verminderte sich in allen Fällen nach der Geburt und war 4 bis 6 Tage später verschwunden.

Die untersuchten Harne stammten aus der Zeit der heftigsten Anfälle.

Die Enteiweißung wurde wie oben vorgenommen.

Die Bestimmung der adialysablen Substanzen ergab folgendes:

Nr.	Dialysierte Harnmenge ccm	Darin nicht dialysierbarer Rückstand g	Adialysable Substanz pro Liter Harn g
1	20	0,0472	2,36
2	15	0,0337	2,25
3	20	0,1394	6,97
4	20	0,0884	4,42

Wie aus diesen Zahlen zu ersehen, zeigt der (enteiweißte) Harn der Eklamptischen eine erhebliche, zum Teil sehr auffällige Zunahme an adialysabler Substanz. Daß dabei der Eiweißgehalt nicht von Bedeutung ist, geht nicht nur daraus hervor, daß die beobachtete Steigerung weit über das oben am Eiweißharn der Nephritischen nachgewiesene Maximum hinausgeht, sondern auch aus dem Fehlen eines jeden Parallelismus zwischen Eiweißgehalt und Menge des adialysablen Restes. So war Harn 4 nahezu eiweißfrei, Harn 1 aber sehr eiweißreich, während die oben angeführten Werte das umgekehrte Verhalten zeigen.

Der adialysable Rückstand zeigte in allen vier Fällen etwas abweichende Eigenschaften. Er verbrannte auf dem Platinblech ohne deutlichen Karamelgeruch, gab deutliche Millonsche und Schwefelblei-Probe, schwache Xanthoproteïn- und Adamkiewiczsche Reaktion. Phosphor schien reichlicher als sonst vorhanden. Die Probe auf Chondroitinschwefelsäure mit Eiweiß war eben nur angedeutet. Vielleicht wird die Chondroitinschwefelsäure bei der Eiweißkoagulation, die in saurer Lösung erfolgen muß, mit entfernt.

So bemerkenswert die in diesen Fällen nachweisbare Vermehrung der adialysablen Bestandteile bei Eklampsie ist, und so sehr sie auch zu Betrachtungen über deren Pathogenese anregen

mag, so halte ich es doch für verfrüht, auf ihre Bedeutung einzugehen. Um sie als eine für die Eklampsie konstante Erscheinung zu bezeichnen, ist die Zahl der Beobachtungen doch zu klein. Auch fehlt noch der Nachweis, daß es sich dabei um etwas für die Krankheit Spezifisches handelt. Ich behalte mir vor, auf diese Fragen auf Grund weiterer Untersuchungen einzugehen, zumal da mir jetzt die Möglichkeit geboten ist, Eklampsiefälle in größerer Zahl zu untersuchen. Dabei dürfte sich auch die Möglichkeit ergeben, auf die bisher nicht berührte Frage einzugehen, ob dem adialysablen Rückstande des Eklampsieharns im Gegensatz zu jenem des normalen Harns[1]) besondere Giftwirkungen zukommen.

[1]) Vgl. K. Sasaki, S. 392.

XXVII.

Untersuchungen über den Glykogenumsatz in der Kaninchenleber.

Erste Mitteilung.

Von Prof. Dr. **Ivar Bang**, und den Amanuensen **Malte Ljungdahl** und **Verner Bohm.**

Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium der Universität zu Lund.

Bekanntlich wird in der Leber sowohl Glykogen aus Zucker gebildet, als auch gebildetes Glykogen in Zucker umgewandelt. Die Zuckerbildung aus Glykogen ist vom Standpunkte der Physiologie und der Lehre vom Diabetes von der größten Bedeutung. Trotzdem sind unsere Kenntnisse über diesen fundamental wichtigen Vorgang recht beschränkt.

Zwar wissen wir, daß die frisch entnommene Leber ihr Glykogen mehr oder wenig vollständig und ziemlich schnell in Zucker umwandelt, und man nimmt meist an, daß diese Umsetzung durch ein diastatisches Enzym[1]) in der Leber bewirkt wird. Allgemein anerkannt ist aber die Existenz des Leberenzyms jedoch nicht, da z. B. Bial u. a. seine Existenz leugnen. Nach Bial kommen nur die diastatischen Enzyme des Blutes und der Lymphe in Betracht. Aber selbst wenn man das Vorkommen dieses Fermentes in der herausgenommenen Leber zugibt, ist hiermit noch nicht die intravitale Existenz desselben bewiesen. Vielmehr halten manche Beobachter die Saccharifikation des Glykogens für eine postmortale Erscheinung, bedingt durch ein beim Absterben der Leber frei werdendes Ferment. Von diesen Beobachtern wird die intravitale Zuckerbildung aus Glykogen als ein Resultat „der Tätigkeit der Zellen“ aufgefaßt.

---

[1]) Auf die Literatur des Enzyms einzugehen ist überflüssig, da in letzter Zeit mehrere zusammenfassende Darstellungen erschienen sind. Wir verweisen besonders auf Pflügers „Glykogen“ (II. Aufl., Bonn 1905). Die Geschichte der Leberdiastase findet sich bei Pick (Diese Beiträge 3, 163 ff.) ausführlich besprochen.

Es ist überhaupt nicht ganz sichergestellt, daß der gebildete Zucker ausschließlich aus Glykogen herstammt; Seegen behauptet, daß auch andere Stoffe dazu beitragen.

Absolut zwingend ist überhaupt die intravitale Zuckerbildung aus dem Glykogen der Leber nicht bewiesen, da man noch andere Annahmen machen könnte, z. B. daß das Glykogen als solches aus der Leber austritt, und erst anderswo umgewandelt wird.

Bekanntlich ist bei den vielen verschiedenen Formen von Glykosurie nach Zuckerstich, Nervenverletzungen und Vergiftungen das Auftreten des Zuckers von dem Gehalt der Leber an Glykogen abhängig. Es ist aber nicht bewiesen, daß dabei eine Fermentproduktion in der Leber vorliegt. Nach der Piqûre und nach Nervenverletzungen findet man eine starke Kongestion der Bauchorgane — auch der Leber —, was für eine vermehrte Blutfermentwirkung sprechen könnte. Auch die Tatsache, daß der Zuckerstich nach Unterbindung der Lebergefäße erfolglos bleibt, steht hiermit in Übereinstimmung.

Aber auch wenn man zugibt, daß bei den Glykosurien, ebenso wie im geringeren Maße normal, eine Zuckerbildung aus Glykogen in der Leber stattfindet, und weiter, daß diese Umwandlung von einem spezifischen Leberfermente bewirkt wird, läßt sich zurzeit die Abhängigkeit dieser Zuckerproduktion von der Fermenttätigkeit nicht scharf formulieren. Es bietet sich da die Möglichkeit eines Zusammenwirkens verschiedener Faktoren, z. B. Glykogenbildung und Zuckerproduktion, oder Fermentwirkung und Antifermentwirkung. Eine vermehrte Zuckerbildung aus Glykogen kann daher auf verschiedene Weise zustande kommen. So kann man annehmen: es trifft eine normale Fermentproduktion mit einer verminderten Glykogenbildung, oder eine normale Fermentproduktion mit einer subnormalen Fermenthemmung zusammen, oder es liegt eine vermehrte Fermentproduktion vor. Es wäre auch denkbar, daß die Wirkung des Enzyms sich unter veränderten Bedingungen intensiver gestaltete.

Wenn man aber annimmt, daß bei den Glykosurien in der Tat eine vermehrte Fermentsekretion vorliegt, hätte es großes Interesse, zu erforschen, wie diese Sekretion stattfindet, insbesondere auch, ob man dabei im Sinne von Pawlows glänzenden Beobachtungen eine Übereinstimmung mit anderen Arten von Fermentsekretion nachweisen kann. Wenn man an die hervorragende Wirkung des Nervensystems auf diese Sekretionsvorgänge und weiter an die wichtige Rolle denkt, welche dem Nervensystem

beim Diabetes und vielen Glykosurien unzweifelhaft zukommt, wird man eine solche Übereinstimmung a priori nicht unbedingt von der Hand weisen.

Diese Andeutungen dürften genügen, um zu zeigen, daß ein Studium der Faktoren, welche die physiologische und pathologische intravitale Zuckerbildung aus Glykogen in der Leber beherrschen, der Bedeutung nicht entbehrt.

Sind aber solche Untersuchungen ausführbar? Es handelt sich hier um intravitale Vorgänge in der Leber. Die Verhältnisse liegen aber hier anders als bei Drüsen, wo man das Sekret aufsammeln und untersuchen kann. Zwar kann man das Resultat des Glykogenumsatzes im Blute (in der Vena cava inf.) verfolgen, aber die hierzu notwendigen Eingriffe sind, wie vorsichtig man auch arbeitet, so schwer, daß Störungen der vorhandenen Zuckerproduktion nicht auszuschließen sind. Auch ist, wie schon bemerkt, das Glykogen vielleicht nicht die einzige Quelle des Leberzuckers, was die Ergebnisse komplizieren muß.

Ferner darf man, wie gesagt, die an der überlebenden oder toten Leber erhaltenen Resultate nicht ohne weiteres auf die Verhältnisse der lebenden Leber übertragen. Denn die Voraussetzung hierfür wäre, daß die gesamten hier interessierenden Umsetzungen in der herausgenommenen Leber in demselben Umfange fortgingen, wie im Leben.

Da das nicht zu erwarten ist, so erscheint auf diesem Wege nur eine relative Lösung des Problems erreichbar.

Angenommen, daß im Leben ein Glykogenumsatz stattfindet und sich unter bestimmten Voraussetzungen quantitativ ändert, so muß sich, wenn derselbe Vorgang in der herausgenommenen Leber weitergeht, dieselbe Änderung auch hier geltend machen. Und relativ einfach dürften sich die Verhältnisse gestalten, wenn der Vorgang enzymatischer Natur und das betreffende Enzym in der Tat ein spezifisches Leberferment wäre. In diesem Falle hätte man nur das Blutferment (bzw. die Lymphdiastase) ohne Beeinträchtigung des Leberferments zu eliminieren und letzteres genau quantitativ zu bestimmen.

Wenn dies möglich wäre, so lägen voraussichtlich dieselben Verhältnisse wie bei anderen Enzymuntersuchungen vor. Doch darf man nicht vergessen, daß man auch in diesem Falle wahrscheinlich mit sekundären Reaktionen, eventuell mit Neubildung von Ferment- oder mit Hemmungswirkungen oder anderen Komplikationen zu rechnen hätte.

Die vorliegende Abhandlung soll einen Beitrag zur Lösung einiger der eben berührten Fragen liefern.

Der Ausgangspunkt für unsere Untersuchungen waren Versuche über die Frage, ob die tote Leber ein von der Blut- bzw. Lymphdiastase verschiedenes, diastatisches Enzym enthält oder nicht. Auf Grund zahlreicher in verschiedener Weise variierter Untersuchungen glauben wir in Übereinstimmung mit v. Wittich und anderen behaupten zu können, daß die herausgenommene Rindsleber ein solches Ferment enthält.

Wir finden es überflüssig, diese Versuche anzuführen, da dieses Ergebnis aus den zahlreichen anzuführenden Versuchsprotokollen, auf die wir hiermit verweisen, überzeugend hervorgeht.

Nach Erledigung dieser Vorfrage gingen wir mit Rücksicht auf die oben entwickelten Voraussetzungen zunächst an die Untersuchung der Frage, ob und inwieweit der intravitale Glykogenumsatz unter verschiedenen Verhältnissen ausschließlich bzw. hauptsächlich durch die Tätigkeit des spezifischen Leberenzyms bewirkt wird.

Um der Voraussetzung hierfür, daß die intravitalen Vorgänge sich auch in der herausgenommenen Leber abspielen können, nach Möglichkeit zu genügen, war es notwendig, dafür Sorge zu tragen, daß die unmittelbar vor der Leberexstirpation vorhandene Enzymquantität unverändert erhalten, die voraussichtlich störende Blut- und Lymphdiastase aber vollständig entfernt werde. Es war ferner notwendig, unmittelbar vor der Leberexstirpation jede Erregung zu vermeiden, die etwa zu Fermentproduktion führen konnte. Es war demgemäß ausgeschlossen, die Versuchstiere vor der Leberexstirpation zu töten, denn der Tod oder die Eingriffe, welche denselben bewirken, dürften höchstwahrscheinlich eine sehr bedeutende Erregung des Nervensystems herbeiführen, von der man a priori nicht wissen kann, ob sie nicht auch die Produktion des Leberenzyms beeinflußt. Daß die Zuckerproduktion in der Leber — jedenfalls zum Teil — vom Nervensystem abhängig ist, dafür geben schon Cl. Bernards Beobachtungen unzweifelhafte Beweise. Wir haben daher die Leber den Versuchstieren — immer Kaninchen — möglichst rasch in Äthernarkose exstirpiert.

Freilich führt man hierbei in der Narkose vielleicht ein neues, die Sekretion beeinflussendes Moment ein; wir glauben aber, daß die angewandte leichte Narkose, zu der stets nur etwa 3 bis 4 Minuten genügten, ohne Einfluß blieb.

Weiter war es notwendig, die Operation so schnell wie nur möglich zu Ende zu führen; denn schon die Öffnung der Bauchhöhle kann bekanntlich zu Glykosurie führen, und man konnte nicht wissen, wie schnell die reflektorische Fermentproduktion etwa eintritt. Die ganze Operation, Eröffnung der Bauchhöhle und Herausnahme der Leber, dauerte kaum eine halbe Minute. Hierdurch wurde im Moment der Gefäßdurchschneidung der Einfluß des Nervensystems so gut wie vollständig ausgeschaltet, und wir hatten daher fernerhin nur einer direkten nicht reflektorischen Produktion von neuem Leberenzym und sekundären Reaktionen Rechnung zu tragen. Wir mußten deswegen bei allen weiteren Eingriffen so indifferente Mittel als nur möglich in Anwendung bringen.

Nach der Exstirpation hatten wir die Blut- und Lymphdiastase und zwar möglichst rasch zu entfernen, um die Imbibition des Parenchyms damit zu verhindern, sowie um der Koagulation des Blutes in den Lebergefäßen vorzubeugen. Da sich das Leberferment nur intracellulär findet, konnte man hoffen, bei Durchspülung der Leber von der V. portae aus mit 0,8 proz. Kochsalzlösung [1]) alles Blut zu entfernen, ohne das Leberferment mitauszuschwemmen.

Die Kochsalzlösung wurde so lange injiziert, bis die Leber ganz blaß wurde, und das Spülwasser farblos abfloß. Durch Anwendung körperwarmer Kochsalzlösung wurde dies — besonders wenn man zugleich die Leber etwas massierte — sehr bald, in 1 bis 2 Minuten erreicht. Dabei ist zu beachten, daß man die Ausspritzung nicht länger als notwendig fortsetzen darf, da sonst ein Verlust an Leberferment zu befürchten ist. Bei einiger Übung vermeidet man diese Fehlerquelle leicht. Übrigens ist die Klarheit des Spülwassers dafür ein guter Indikator. Es läuft zuerst ganz klar ab, beginnt aber später zu opalisieren, was anzeigt, daß mit dem Spülwasser Glykogen und somit wohl auch andere Zellbestandteile ausgeschwemmt werden.

Wir glauben so erreicht zu haben, die Blutdiastase ziemlich vollständig zu entfernen, ohne die Leberfermentmenge zu vermindern. Ob bei dieser Prozedur auch die Lymphdiastase entfernt wird, läßt sich selbstverständlich nicht direkt entscheiden. Aus Gründen, die später angeführt werden sollen, glauben wir auch dies erreicht zu haben.

Bei der Untersuchung auf das vorhandene Leberferment sind wir nicht den z. B. von F. Pick eingeschlagenen Weg gegangen, die zerhackte Leber mit Alkohol zu fällen und das Leberpulver mit Kochsalzlösung zu extrahieren. Denn einmal ist es sehr schwierig, zu beurteilen, ob oder wann bei der Extraktion alles Ferment ausgezogen ist. Wichtiger noch ist aber, daß man mit der Verwendung von Alkohol ein Moment einführt, welches eine Beeinflussung der Fermentmenge in verschiedenen Richtungen be-

[1]) Die meisten früheren Untersucher haben hierzu Wasser benutzt, was sicher fehlerhaft ist, da die Leberzellen darin des osmotischen Überdruckes wegen stark aufquellen bezw. platzen.

wirken kann. Es ist denkbar, daß der Alkohol eine der Fermentwirkung entgegenstehende Hemmung beseitigt oder das Ferment schädigt oder auch Bildung von neuem Enzym auslöst. In der Tat haben wir in einigen nach dieser Richtung angestellten Versuchen eine Beeinflussung der Fermenttätigkeit beobachtet.

Wir haben daher folgende Versuchsanordnung vorgezogen. Gewogene Quantitäten Leberbrei werden mit 0,8 proz. Kochsalzlösung vier Stunden bei 37° C digeriert, und dann bestimmt man behufs Ermittelung des Fermentgehaltes die Abnahme des Leberglykogens. Wenn die Leber wenig oder kein Glykogen enthält, wird Glykogen zugesetzt. Zum Vergleich dienen Proben von Leberbrei, die erst gründlich aufgekocht und dann auf dieselbe Weise behandelt werden.

Unsere Arbeitsmethode gestaltete sich danach folgendermaßen. Das Kaninchen, welches gewöhnlich vorher Zucker bekommen hatte, wurde aufgebunden und narkotisiert, die Leber so schnell wie möglich herausgenommen, augenblicklich mit körperwarmer Kochsalzlösung durchgespült, und nach der Entfernung der Gallenblase, des Bindegewebes, eventuell auch blutig tingierter Leberstückchen, gewogen und zerhackt. Von dem Leberbrei wurden zwei, eventuell mehrere Proben zu 25 g abgewogen und mit 25 ccm Kochsalzlösung versetzt. Nach Aufkochen der Kontrollprobe wurden beide Proben mit Toluol versetzt und gründlich durchschüttelt. Nach der Digestion im Thermostaten wurde die Glykogenbestimmung nach einer modifizierten Pflügerschen Methode [1]) vorgenommen.

Das Verfahren besteht darin, daß der Leberbrei in einem Becherglase mit 50 ccm 60 proz. Kalilauge bis zur Lösung gekocht wird. Die Lösung wird in einen Meßzylinder übergeführt und mit Wasser auf 150 ccm aufgefüllt. Mit einer Pipette werden 50 ccm in ein mit 50 ccm 96 proz. Alkohol versetzten Zentrifugenröhrchen übergeführt. Man zentrifugiert, dekantiert ab, löst den Bodensatz in 25 ccm 15 proz. KOH, setzt 50 ccm Alkohol hinzu und zentrifugiert nochmals [2]). Nach Dekantation wird der Bodensatz erst mit Alkohol ausgewaschen (was ich jedoch später als überflüssig unterlassen habe) und in 50 ccm Wasser gelöst. Man setzt ein Paar Tropfen Phenolphthaleïn hinzu, neutralisiert mit Salzsäure und setzt weiter davon bis zu 2,2 Proz. HCl hinzu, kocht drei Stunden im Wasserbade, verdünnt nach Neutralisation mit 150 ccm und bestimmt das Glykogen als Zucker.

In den meisten Versuchen wurde der Zucker nach Fehling-Soxhlet bestimmt, in ziemlich zahlreichen Parallelversuchen nach einem neuen, von mir [3]) ausgearbeiteten Verfahren, welches viel genauere Bestimmungen zuläßt. Das Glykogen ist immer als Zucker berechnet.

Bei dieser Methode werden folgende das Versuchsresultat eventuell beeinflussende Momente eingeführt: 1. Die Exstirpation, welche jedoch an sich

---

[1]) Bang, Über die Verwendung der Zentrifuge usw. Festschrift f. Hammarsten.

[2]) Mit demselben Erfolg kann man anstatt in KOH den Bodensatz in Wasser lösen.

[3]) Bang, Zur Methodik der Zuckerbestimmung. Biochem. Zeitschr. 2.

keine direkte Fermentproduktion veranlassen dürfte. 2. Die Abkühlung der Leber nach der Exstirpation. 3. Die Kochsalzdurchspülung. 4. Das Zerhacken der Leber. 5. Der Zusatz von Toluol. Welche Bedeutung diese Momente eventuell für das Auftreten von sekundären mit Fermentproduktion oder Fermenthemmung einhergehenden Reaktionen haben, läßt sich nur aus Vergleichsversuchen ersehen.

Die Methode ist ferner mehrfach mit Fehlerquellen behaftet. 1. Man hat, wie erwähnt, keine volle Sicherheit dafür, daß nicht eine unbekannte wechselnde Menge Leberferment bei der Durchspülung entfernt wird. Auf der anderen Seite könnte etwas fremdes Ferment zurückbleiben. 2. Die Entfernung des Bindegewebes ist keine vollständige, überdies enthält der Leberbrei noch die Gefäße. Obwohl immer darauf geachtet wurde, ist es doch kaum zu umgehen, daß bisweilen ein Teil davon in die abgewogenen Proben gerät. Doch ist auch diese Fehlerquelle sicher gering. Ferner ist eine geringe Inhomogenität der Leberbreiproben nicht ausgeschlossen. Auch dies dürfte wenig in Betracht kommen. 3. Wir haben zwar unsere Proben mit Toluol versetzt und umgeschüttelt. Hiermit ist jedoch die Gefahr einer Bakterienentwickelung nicht sicher ausgeschlossen. Es ist zu bedauern, daß keine Untersuchung über die Sterilität der Proben ausgeführt worden ist. Bei einer bloß vierstündigen Digestion kann jedoch die Bakterienentwickelung nur eine äußerst beschränkte sein und dürfte jedenfalls die Ergebnisse nicht merklich stören, zumal da bekannt ist, daß das Glykogen durch Bakterien wenig angegriffen wird. Was die Glykogenbestimmung betrifft, so haben wir die Methode so genau durchgeprüft, daß wir bestimmt Versuchsfehler von irgend welcher Bedeutung anschließen können. Dagegen ist bekanntlich die Fehlingsche Methode nur approximativ, was einen Versuchsfehler bedingen kann.

Bei den späteren Untersuchungen, wo die neue Methode des Verfassers zur Verwendung kam, fällt jedoch diese Möglichkeit weg[1]).

Größere Bedeutung kommt diesen Fehlerquellen nicht zu, da wir bei zahlreichen Doppelbestimmungen immer eine gute Übereinstimmung gefunden haben.

Endlich haben wir auch die Möglichkeit zu berücksichtigen, daß in den Proben eine Glykogenbildung vorkommen und daß dementsprechend der gefundene Glykogenumsatz das Resultat von zwei entgegengesetzten Prozessen darstellen könnte. Obwohl die allgemeine Auffassung in der Richtung geht, daß die überlebende Leber nicht, oder jedenfalls nur sehr kurze Zeit — einige Minuten —, Glykogen zu bilden vermag, haben wir trotzdem spezielle Versuche hierüber angestellt und zwar immer mit dem Ergebnis, daß mit Zucker versetzter Leberbrei kein Glykogen neu bildet. Wir brauchen also diese Eventualität nicht zu berücksichtigen.

---

[1]) Hierzu kommen noch beim Vergleiche der verschiedenen Versuche andere Momente als: Individualität der Tiere, Alter usw

Es bleibt noch die Frage zu erörtern, welche wohl alle früheren Forscher von dem Studium des Leberenzyms abgehalten hat, nämlich: Ist eine genügend vergleichbare Bestimmung der Fermentwirkung ausführbar, kann man aus dem beobachteten Glykogenumsatz auf eine bestimmte Fermentquantität schließen?

Es ist klar, daß man von dem Standpunkte von Pavy, Dastre, Noël-Paton, Cavazzani aus, wenn man die Existenz eines Leberenzyms leugnet, überhaupt keine Veranlassung zum Studium eines solchen hat. Aber auch, wenn man sich zu der wohl jetzt allgemein angenommenen Ansicht bekennt, daß der intravitale Glykogenumsatz von dem spezifischen Leberenzym bewirkt wird, stößt man auf die Schwierigkeit, daß man die Wirkungsgesetze dieses Fermentes nicht kennt, somit eine in Zahlen auszudrückende genaue quantitative Ermittelung ausgeschlossen ist. Die Größe des Glykogenumsatzes dürfte aber doch einen Schluß gestatten, ob eine größere oder geringere Fermentmenge vorliegt, was immerhin einen Fortschritt bedeutet. Ließe sich nämlich unter verschiedenen Verhältnissen eine der physiologischen bzw. pathologischen Zuckerproduktion entsprechende Fermentmenge finden, so wäre hiermit der Glykogenumsatz als Fermentwirkung endgültig festgestellt. Und dies wäre für das Verständnis besonders der pathologischen Zuckerproduktion nicht ohne Bedeutung. Wenn z. B. die Piqûre bei glykogenarmen Kaninchen keine Glykosurie bedingt, ist hiermit nicht bewiesen, daß die Piqûre unwirksam ist. Die vermutete erhöhte Fermentproduktion kann nämlich auch dann noch vorliegen, ihre Wirkung aber wegen Mangels an Glykogen ausbleiben. Infolgedessen kann sich die Fragestellung bei sämtlichen Diabetesformen bei Bestimmung des Leberenzyms viel rationeller als früher gestalten, da man unabhängig von dem sehr wechselnden Glykogengehalt direkt an die Erforschung der Hauptsache, die Leistung der Leber, gehen kann.

Nun kann man einwenden, daß der prozentische Glykogenumsatz möglicherweise keinen Maßstab der Fermentmenge abgibt, nämlich falls der Umsatz von der absoluten Glykogenmenge derartig abhängig ist, daß man bei gleicher Fermentquantität einen größeren prozentualen Umsatz mit wenig als mit viel Glykogen erhält. Durch besonders hierauf gerichtete Versuche glauben wir aber feststellen zu können, daß man aus dem prozentualen Umsatz in der Tat auf die Fermentmenge annähernd schließen kann, wenn nicht allzu kleine Glykogenquantitäten vorliegen. Übrigens haben wir durch Zusatz von Glykogen zu große Differenzen aus-

zugleichen gesucht, wenn die Leber sehr glykogenarm war, und uns dadurch von dem präformierten Leberglykogen unabhängig gemacht, worüber später berichtet wird.

Soviel geht jedoch aus den angeführten Versuchsfehlern hervor, daß man nur aus mehreren Tierversuchen bestimmtere Folgerungen ziehen kann. Wir haben in der Tat jede Einzelfrage gewöhnlich durch eine ganze Serie von Tierversuchen zu beantworten gesucht.

Wie bemerkt, betreffen unsere Untersuchungen mehrere verschiedene Fragepunkte; im nachfolgenden gelangen sie abschnittweise zur Erörterung.

1. Der Glykogenumsatz bei gutgenährten Tieren.

Die Kaninchen, welche bei diesen Untersuchungen benutzt werden sollten, wurden reichlich genährt und bekamen 16 Stunden vor der Operation gewöhnlich 25 bis 30 g Traubenzucker durch die Schlundsonde.

Bei solchen gutgenährten Tieren wird die intravitale Zuckerproduktion der Leber höchstwahrscheinlich derartig reguliert, daß ein geringer aber konstanter Glykogenumsatz fortbesteht, und zwar dürfte er dem Zuckerverbrauch entsprechen, da der Blutzuckergehalt sich nicht verändert.

Es ist ferner anzunehmen, daß bei glykogenreichen Lebern ein geringerer, bei glykogenarmen ein größerer prozentualer Umsatz vorkommt, weil sonst der Blutzuckergehalt bei konstantem Verbrauch stark schwanken müßte, was bekanntlich nicht der Fall ist, wenn man die Assimilationsgrenze nicht überschreitet.

Ist nun die Voraussetzung richtig, daß die vitalen Vorgänge sich in der herausgenommenen Leber weiter abspielen, muß man in den Lebern gutgenährter Tiere einen geringen, dem Glykogengehalte nach etwas variierenden Umsatz vorfinden.

Die Versuchsergebnisse sind in der nebenstehenden Tabelle I zusammengestellt.

Aus der Tabelle geht hervor, daß der Glykogenumsatz in 4 Stunden bei 37° C durchschnittlich nur 6,6 Proz. der Glykogenmenge ausmacht, und daß nicht weniger als 93,4 Proz. Glykogen persistieren. Der durchschnittliche Umsatz ist 0,67 g (von 0,37 bis 1,30 g) bei einem durchschnittlichen Glykogengehalte von 12,2 g. Der absolute Umsatz pro Stunde ist 0,17 g. Vergleicht man hiermit Cl. Bernards Beobachtungen, daß die herausgenommene Leber bei gewöhnlicher Temperatur in der ersten halben Stunde

Tabelle I[1]).

Versuch-Nr.	Lebergewicht g	Gesamtglykogen g	Glykogen Proz.	Gesamtumsatz g	Umsatz in Proz. des Gesamtglykogens
1	60	4,0[3])	6,7	0,37	9,3
2	72[2])	5,0[3])	7,0	0,40	8,0
3	102	8,1	8,0	0,73	9,0
4	125	16,3	13,0	1,30	8,0
5	133	16,1	12,1	0,64	4,0
6	185	23,5	12,7	0,54	2,3
	Mittel . .	12,2	—	0,67	6,6

das meiste Glykogen umsetzt, so tritt der fundamentale Unterschied bei unseren Versuchen unzweideutig hervor.

Nun ist es aber bekannt, daß viel, ja das meiste Glykogen schon in der ersten Minute umgesetzt wird und es war deswegen denkbar, daß schon bei den vorbereitenden Manipulationen viel Glykogen umgesetzt worden war. Der dabei gebildete Zucker konnte die weitere Fermenttätigkeit zum Stillstand gebracht haben. Wir hatten ja die Leber ausgewaschen, gewogen, zerhackt, mehrere Portionen des Leberbreies wieder abgewogen und erst dann die Kontrollproben gekocht. Hierzu bedurfte es gewöhnlich 15 bis 20 Minuten — bei einiger Übung etwas weniger. Es wurde daher der übrig gebliebene Leberbrei (der somit noch länger gelegen hatte) auf Zucker untersucht. In keinem Fall haben wir mehr als Spuren von Zucker entdecken können. Bei einer Leber haben wir den Glykogengehalt nach einstündiger Aufbewahrung bei Zimmertemperatur bestimmt und keinen Umsatz gefunden, die Kontrollprobe ergab denselben Wert. Wir haben auch bei den späteren Versuchen den Leberbrei immer wieder auf Zucker untersucht und können hier ein für allemal feststellen, daß bei der vorbeschriebenen Verarbeitung kein nennenswerter Glykogenumsatz erfolgt.

Aus unseren Versuchen geht also hervor, daß die herausgenommene Leber gutgenährter Tiere ein spezifisches, diastatisches Enzym, obwohl nur in geringer Menge, enthält.

---

[1]) Versuche von Bang und Ljungdahl.
[2]) Jede Probe à 20 g.
[3]) Bekamen keinen Zucker vorher.

Hiergegen könnte eingewendet werden, daß eben der kleine Umsatz darauf hindeutet, daß dabei nur die Blut- und Lymphdiastase in Betracht komme; namentlich da sich nicht beweisen läßt, daß die Lymphdiastase durch die Ausspülung vollständig entfernt ist, könnte man für den vorliegenden Fall ebensogut das Zurückbleiben einer geringen Menge von Lymphdiastase wie die Existenz einer spezifischen Leberdiastase zur Erklärung heranziehen.

Wäre dieser Einwand berechtigt, so sollte man in Parallelproben der verschiedenen Versuche mit derselben Quantität Blut eine entsprechende Übereinstimmung der Versuchsergebnisse finden, d. h. in den Versuchen, welche den größten Glykogenumsatz repräsentieren, sollte auch das Blut reicher an Diastase sein als dort, wo man einen geringeren Umsatz findet. Denn es ist jedenfalls nicht wahrscheinlich, daß in den verschiedenen Versuchen eine wesentlich verschiedene Menge von Blut und Lymphe zurückgeblieben ist. Solche Parallelversuche sind von uns bei den fünf letzten Versuchen angestellt worden.

Die abgewogene Leberquantität wurde mit 10 ccm Blut + 15 ccm NaCl-Lösung versetzt und 4 Stunden unter Zusatz von Toluol bei 37° C digeriert. Tabelle II gibt eine Übersicht der Befunde. Zum Vergleich ist der Glykogenumsatz ohne Blut danebengestellt.

Tabelle II.

Versuch-Nr.	Glykogenumsatz ohne Blutzusatz		Glykogenumsatz bei Blutzusatz		vom Blut umgesetzt	
	a) in Gramm	b) in Proz.	a) in Gramm	b) in Proz.	a) in Gramm	b) in Proz.
2	0,40	8,0	1,44	29,0	1,04	21,0
3	0,73	9,0	1,46	18,0	0,73	9,0
4	1,30	8,0	4,24	26,0	2,94	18,0
5	0,64	4,0	2,90	18,0	2,26	14,0
6	0,54	2,3	5,62	24,0	5,08	21,7
	0,67	6,6	3,13	23,0	2,46	16,7

Aus diesen Versuchen geht nun mit Gewißheit hervor, daß die Fermentkonzentrationen des Blutes und der Leber ganz verschieden sein müssen, da sie keinen Parallelismus erkennen lassen.

Man beobachtet im Gegenteil im Versuche 6 das entgegengesetzte Verhalten, den kleinsten Umsatz ohne, den größten mit Blut. Aber auch das ist nicht konstant, da man im Versuche 2 bzw. 4 einen reichlichen Umsatz in beiden Proben findet. Die Versuche scheinen uns daher dafür zu sprechen, daß der Glykogenumsatz in diesen Kaninchenlebern nichts mit der Blut-

diastase zu tun hatte, eine Tatsache, die sich aus weiteren Versuchen vielleicht noch überzeugender ergibt.

Wir sehen daher als erwiesen an, daß die oben erwähnten sechs Kaninchenlebern in geringer Menge eine spezifische Leberdiastase enthalten haben, und es ist anzunehmen, daß die gefundene Enzymmenge der Zuckerproduktion in der Leber entspricht, die vor dem Versuch während des Lebens bestanden hatte. Die Tatsache, daß bei so höchst verschiedenem Glykogengehalt der absolute Umsatz ein ziemlich konstanter ist, ist ein sehr überzeugendes Argument für diese Auffassung.

Die mit Blut versetzten Proben ergeben aber auch einen geringeren Umsatz als erwartet. Hier sind nur durchschnittlich 23,0 Proz. Glykogen in 4 Stunden bei 37° C umgesetzt, während Cl. Bernard u. a., wie erwähnt, unter viel ungünstigeren Versuchsbedingungen einen weit größeren Umsatz beobachtet haben. Die Erklärung dieser Differenz liegt in der Tatsache, daß die früheren Forscher ihre Tiere erst töteten und nachher die Leber exstirpierten. Hierdurch wird ein neues Versuchsmoment eingeführt, dessen Wirkung wir später genauer erörtern wollen.

Die große Bedeutung dieser Versuche an „Normal“-Tieren machte entschieden weitere Untersuchungen wünschenswert. Wenn wir uns über die Fermenttätigkeit bei Diabetes und Hyperglykämien überhaupt orientieren wollten, mußten wir immer die Normalversuche zum Vergleich heranziehen. Deswegen haben wir das gefundene Ergebnis noch weiter sicherzustellen versucht.

Solche Untersuchungen waren auch gar nicht überflüssig, wie man aus der folgenden Tabelle ersehen kann.

Tabelle III[1]).

Versuch-Nr.	Gewicht des Kaninchens g	Lebergewicht g	Gesamtglykogen g	Leberglykogen Proz.	Gesamtumsatz g	Umsatz Proz.
7	2600	114	10,8	9,5	1,18	11,0
8	3500	177	15,2	8,6	1,06	7,1
9	3000	112	17,3	15,4	1,64	9,5
10	2100	82	4,9	6	0,49	10,0
11	2800	84	4,5	5,4	0,43	9,6
		Durchschnittlicher Umsatz			0,96	9,4

[1]) Versuche von Bang.

Sämtliche Tiere bekamen vorher Zucker, und besonders in den zwei letzten Versuchen vom 30. April und 3. Mai 1906 ist nur wenig Glykogen abgelagert worden. In vier anderen Versuchen (wo der Umsatz nicht bestimmt wurde) betrug das Gesamtglykogen 3,64, 1,17, 5,00 und 5,25 g, trotzdem die Tiere neben reichlichem Rübenfutter 20 g Zucker erhalten hatten.

Der durchschnittliche Umsatz bei diesen Tieren ist etwa 30 Proz. größer als bei denjenigen der ersten Serie. Die einzig mögliche Erklärung hierzu — die Richtigkeit der Versuchsresultate vorausgesetzt — ist, daß diese Tiere im April und Mai untersucht wurden, während die ersten Tiere im November und Dezember zur Verwendung kamen. Gürber[1]) verdanken wir die interessante Beobachtung, daß Sommerkaninchen viel weniger Glykogen in der Leber ablagern als die Wintertiere. Es könnte dann nicht wundernehmen, daß im Sommer, wo die Verhältnisse der Glykogenablagerung verändert sind, eine vermehrte Fermentproduktion vorliegt.

Die Untersuchungen wurden deswegen in der kalten Jahreszeit wieder aufgenommen. Die folgenden Versuche sind alle im November 1906 ausgeführt.

Tabelle IV[2]).

Versuch-Nr.	Gewicht des Kaninchens g	Gewicht der Leber g	Gesamt-glykogen g	Glykogen Proz.	Gesamt-umsatz g	Umsatz Proz.
12	2000	149	21,7	14,5	2,17	10,0
13	2250	109	11,0	10,0	0,55	5,0
14	2400	80	3,5	4,3	0,14	2,9
15	2100	110	13,0	11,8	1,04	8,0
16	2100	120	11,9	10,0	0,85	7,2
17	2100	150	16,9	11,3	0,44	2,6
	Durchschnittlich . .		13,0	—	0,87	5,9

Wir können dementsprechend unser früheres Ergebnis als richtig annehmen und können weiter behaupten, daß Sommerkaninchen zu Untersuchungen der Fermenttätigkeit der Leber unter wechselnden physiologischen Verhältnissen nicht recht geeignet sind. Sämtliche folgende Untersuchungen sind denn auch in den Monaten November bis März ausgeführt.

Aus den Tabellen I bis IV ist ersichtlich, daß die Variationen des Fermentgehaltes nicht dem Glykogengehalt genau entsprechen.

[1]) Sitzungsberichte d. phys.-med. Gesellschaft zu Würzburg 1895, S. 17.
[2]) Versuche von Bang.

Man dürfte aber von vornherein erwarten, wenn die Zuckerproduktion konstant sein soll, daß die glykogenreichsten Lebern den relativ kleinsten Umsatz aufweisen sollten. Bei unserem Verfahren entziehen sich aber sicher solche Einzelheiten der Beobachtung.

Dieser Frage haben wir deswegen näher zu treten versucht, indem wir den Glykogenumsatz bei Hungertieren untersuchten. Wenn man eine Versuchsserie an Tieren anstellt, welche alle nur wenig Leberglykogen besitzen und deswegen relativ mehr Glykogen umsetzen müssen, um den Blutzuckergehalt unverändert hoch zu halten, so hat man darin voraussichtlich eine Möglichkeit zur Klarstellung dieses Verhältnisses.

2. Der Glykogenumsatz bei Hungertieren.

Da bekanntlich der größte Teil des Leberglykogens schon in den ersten Hungertagen verbraucht wird, haben wir die Tiere nach einer kurzen Hungerperiode untersucht.

Tabelle V[1]).

Versuch-Nr.	Lebergewicht	Gesamtglykogen	Glykogen	Mit Gl.-Lösung versetzt		Gesamtumsatz	Umsatz	Hungertage
				Gesamtglykogen	Glykogen			
	g	g	Proz.	g	Proz.	g	Proz.	
18	60	0,336	0,56	1,540	2,56	0,264	17,2	1
19	65	0,156	0,24	1,456	2,24	0,210	14,29	1
20	85	3,700	4,34	4,632	5,45	0,570	11,0	1
21	65	0,156	0,24	6,600	10,15	0,702	10,23	1½
22	48	0,123	0,26	4,930	10,27	0,648	13,13	2
23	50	0,600	1,20	1,60	3,20	0,240	15,0	2
—	—	0,845	—	3,50	—	—	13,0	—

Die zugesetzte Glykogenmenge war bekannt. Der Glykogengehalt der Leber ist aus der Differenz gefunden. In den Kontrollproben ist der gefundene Glykogengehalt mehr dem zugesetzten Glykogen als Glykogengehalt der Leber berechnet.

Aus der Tabelle geht hervor, daß die Versuche 18 bis 23 Hungertiere mit verschiedenem, immer aber geringem Glykogengehalt umfassen (von 0,123 bis 3,7 g Glykogen). Da der geringste Glykogengehalt der Tabelle I, Nr. 1 nur 4 g ausmacht, haben wir demgemäß mit einer kontinuierlichen absteigenden Glykogenmenge in den Lebern zu tun.

[1]) Versuche von Bohm.

Stellt man die Durchschnittswerte der Glykogenabnahme bei gut genährten und Hungertieren einander gegenüber, so tritt der Unterschied besonders deutlich hervor, 6,3 gegen 13 Proz. Trotzdem wir die Gesetze der Fermentwirkung nicht kennen, geht hieraus doch unzweifelhaft hervor, daß die Leber der Hungertiere eine weit größere Fermentmenge besitzt. Eine so große Differenz läßt sich unmöglich aus dem Zurückbleiben von Blut- oder Lymphdiastase erklären, da sämtliche 23 Lebern in genau derselben Weise verarbeitet wurden.

Freilich ist durch diese Befunde nicht ausgeschlossen, daß die Blutdiastase eine Rolle bei dem intravitalen Glykogenumsatze der Leber spielt. Eine solche Rolle dürfte indessen nur eine untergeordnete sein. Wie schon erwähnt, wird die Zuckerproduktion in der Weise reguliert, daß der Gehalt an Blutzucker, welcher in erster Linie von dem Leberglykogen herstammt, wenn möglich, ein konstanter bleibt. Die Quantität des zu jeder Zeit produzierten Zuckers ist also bei konstantem Verbrauche annähernd derselbe. Enthält die Leber viel Glykogen, so genügt wenig Ferment, enthält sie wenig, so muß mehr Enzym produziert werden um die Zuckerproduktion nach Möglichkeit unverändert zu erhalten. Und wenn es möglich ist, aus den gefundenen Tatsachen das Verhalten zu erklären, liegt kein Grund vor zu anderen hypothetischen Vorstellungen zu greifen.

Wir kommen hier auf die prinzipielle Frage zurück, ob nicht in der Tat bei einem geringen Glykogengehalt dieselbe Fermentmenge einen größeren Umsatz bewirken kann. Wir glauben dies mit großer Wahrscheinlichkeit verneinen zu können. In allen Versuchen wurde Glykogen zugesetzt, um zu große Differenzen des Glykogengehaltes zu vermeiden, und aus den Versuchen 10 und 11 ist besonders zu ersehen, daß hier der prozentuale Glykogengehalt ebensogroß geworden ist, als bei einigen Versuchen der Tabelle I, und trotzdem hat man hier einen Umsatz von 10,23 bzw. 13,13 Proz. Hierzu ist noch zu bemerken, daß das zugesetzte Glykogen unvollständiger als das Leberglykogen umgesetzt wird. Denn trotz der Zerkleinerung des Lebergewebes wird doch sicher das Ferment aus ihm nur relativ langsam und unvollständig herausdiffundieren, was zur Folge haben muß, daß das zugesetzte Glykogen in geringerem Grade als das Leberglykogen verzuckert wird. Hierdurch aber gewinnen die Versuchsergebnisse noch an Beweiskraft, da sie auf einen noch größeren Fermentgehalt der Hungerleber schließen lassen.

Wir glauben uns deswegen zu der Folgerung berechtigt, daß der Unterschied des Glykogenumsatzes als Maßstab für die Fermentkonzentration während des Lebens angesehen werden darf.

Ebenso wie man mit Pawlow den funktionellen Zustand des Magens nach der produzierten Fermentmenge beurteilen kann, so dürfte es möglich sein, sich nach unserer Methode über die sekretorische Arbeit der Leber zu orientieren und einen Einblick in die feineren Vorgänge, die sich beim Glykogenumsatze in der Leber abspielen, zu gewinnen.

Wenn wir ferner eingangs darauf hingewiesen haben, daß in der herausgenommenen Leber vielleicht Umsetzungen mit nachfolgender sekundärer Fermentproduktion bzw. Fermenthemmung zu befürchten sind, so hat sich diese Befürchtung nicht bestätigt, und es ist anzunehmen, daß wir nur die intravital vorkommende Fermentmenge gefunden haben.

Nachdem dieser Fundamentalsatz prinzipiell festgestellt war, haben wir die verschiedenen Zustände näher untersucht, wo eine reichliche Zuckerproduktion vorkommt, um deren Abhängigkeit von dem Glykogenumsatz der Leber klarzulegen. Weiter haben wir uns bemüht, den Einfluß anderer Bedingungen zu studieren, welche die Zuckerproduktion der Leber wahrscheinlich beeinflussen und welche sich bis jetzt einer experimentellen Prüfung entzogen haben, z. B. der Einfluß des Todes und der Einwirkungen, welche den Tod nach sich ziehen, letzteres aus dem Grunde, weil voraussichtlich die vermehrte Fermentproduktion früher nachweisbar sein dürfte, als das Auftreten von Zucker im Blut und Harn.

Ehe wir dazu übergehen, sei mit einigen Worten die Bedeutung unserer Versuchsergebnisse für die Erklärung des Hungerdiabetes hervorgehoben. Nach Hofmeister wurden Hunde nach längerem Hungern diabetisch, d. h. sie schieden bei Zufuhr relativ kleiner Stärkemengen Zucker aus. Nach unseren Untersuchungen dürften solche Tiere in der Leber viel Diastase besitzen, welche augenblicklich eine große Zuckerproduktion hervorruft. Es ist bemerkenswert, daß Pflüger (dessen „Glykogen“, S. 528) eine ähnliche hypothetische Erklärung gegeben hat.

Das Vorkommen einer reichlichen Fermentmenge bei Hungertieren ist auch in einer anderen Beziehung bemerkenswert. Bekanntlich schließt man aus dem Auftreten von Glykogen bei Hungertieren nach Fütterung mit verschiedenen Substanzen, daß die betreffende Substanz ein Glykogenbilder ist. Es ist nach dem

Gesagten klar, daß ein negativer Befund bei solchen Versuchen nicht maßgebend sein kann, speziell wenn man wenig Substanz verwendet, da die reichlich vorhandene Leberdiastase das schon gebildete Glykogen vorzeitig verzuckert haben kann[1]).

Nach Untersuchung der Fermentproduktion bei hungernden Tieren lag es nahe, das Verhalten stark arbeitender Tiere zu studieren. Leider sind hierzu Kaninchen wenig brauchbar, so daß wir vorzogen, unsere Aufmerksamkeit anderen Problemen zuzuwenden, und zwar in erster Linie dem Einfluß der beim Tode eintretenden Veränderungen auf die Fermentproduktion.

3. Der agonale Glykogenumsatz.

Im Gegensatz zu den Sekretenzymen, deren Absonderung nach dem Tode aufhört, weisen, wie bekannt, bestimmte intrazelluläre, z. B. die autolytischen Enzyme, gerade dann eine lebhaftere Tätigkeit auf. Die Ursache hierzu ist wahrscheinlich in einer mit dem Tode wegfallenden Regulierung ihrer Tätigkeit zu suchen.

In bezug auf die Zuckerproduktion in der Leber, welche während des Lebens von dem Nervensystem so genau reguliert wird, dürfte man a priori erwarten, daß sich an ihr die beim Tode eintretenden Erschütterungen des Zentralnervensystems bemerkbar machen, namentlich wenn man sich der vom Nervensystem erzeugten Glykosurien erinnert, welche unzweifelhaft durch Störungen der nervösen Regulierung verursacht werden.

Unsere einschlägigen Versuche wurden in der Art ausgeführt, daß wir die Tiere aus der Carotis verbluten ließen, das verlorene Blut durch Injektion von körperwarmer 0,8 proz. NaCl-Lösung in die Jugularis ersetzten. Wenn das Blut nur ganz schwach rot ausfloß, und das Tier sich in der Agonie befand, wurde die Leber nach rascher Eröffnung der Bauchhöhle im Augenblicke exstirpiert und wie oben weiter behandelt.

Wie man sieht, haben wir das sterbende nicht aber das tote Tier untersucht, da wir eventuell auftretende postmortale Veränderungen der bluthaltigen Leber auszuschalten wünschten. Es wurde dabei angenommen, daß die Durchspülung körperwarmer Kochsalzlösung keine direkte Wirkung ausübt.

Tabelle VI gibt eine Übersicht der Ergebnisse.

---

[1]) Aus demselben Grunde darf man nicht Tiere zur Fermentuntersuchung benutzen, ehe sie einige Tage im Laboratorium reichlich gefüttert sind. Die meisten Tiere, die man bekommt, sind geradezu Hungertiere (speziell im Winter).

Tabelle VI [1]).

Versuch-Nr.	Lebergewicht g	Gesamtglykogen g	Glykogen Proz.	Gesamtumsatz g	Umsatz Proz.
24	75	{ 2,88	3,84	0,36	12,5 [2])
		{ 6,00	8,00	0,75	12,5
25	80	6,3	8,00	0,84	13,4
26	82	4,6	5,66	0,57	12,4
27	90	4,5	5,00	0,45	10,0
—	—	4,6	—	0,56	12,1

Wie man sieht, ist der Umsatz hier etwa doppelt so groß als bei den Tieren der Tabelle I.

Es ist hervorzuheben, daß die Leber dieser Tiere viel weniger Glykogen enthielt (durchschnittlich 4,57 g, dort 12,2 g). Der absolute Umsatz ist in beiden Serien ungefähr derselbe (0,56 g und 0,67 g). Im Versuche 14, wo der Glykogengehalt größer ist, findet man jedoch einen ebenso großen Umsatz. Auch zeigen die Kaninchen Nr. 15 und 16 etwa den gleichen Glykogengehalt wie Kaninchen Nr. 1 und 2 (siehe auch die Versuche Nr. 28 und 29). Auf der anderen Seite ist der prozentuale Glykogenumsatz ungefähr derselbe wie bei den Hungertieren.

Man darf somit annehmen, daß bei der Verblutung mit nachfolgender Durchspülung körperwarmer Kochsalzlösung eine etwas vermehrte Fermentproduktion stattfindet.

Es fragt sich nun, wie diese Fermentproduktion aufzufassen ist. Man hat da in erster Linie an die Asphyxie des zentralen Nervensystems und eine dadurch bedingte Anregung zur Zuckerproduktion oder Ausschaltung einer Hemmungsvorrichtung zu denken. Es liegen aber auch noch andere Möglichkeiten vor, es könnte z. B. die Entfernung des Blutzuckers auf die Regulation der Zuckerbildung einwirken. Um diese Möglichkeit experimentell zu prüfen, haben wir Versuche angestellt, in welchen zu der körperwarmen Kochsalzlösung Traubenzucker zugesetzt wurde. Wir lassen die Versuche folgen. (Tab. VII.)

Im Versuche 28 war die 0,8 proz. NaCl-Lösung mit Zucker bis 0,5 Proz., in Nr. 29 bis 0,4 Proz. versetzt. Der Glykogenumsatz war in beiden Versuchen derselbe wie in den Durchspülungs-

[1]) Diese und die folgenden Versuche sind von Bang und Bohm ausgeführt.

[2]) Da wir gleich bemerkten, daß diese Leber arm an Glykogen war, stellten wir noch Parallelversuche mit Glykogenzusatz an.

Tabelle VII.

Versuch-Nr.	Lebergewicht g	Gesamtglykogen g	Glykogen Proz.	Gesamtumsatz g	Umsatz Proz.
28	92	8,71	9,46	1,32	15,12
29	123	7,68	6,25	1,10	14,27
					14,7

versuchen ohne Zuckerzusatz. Dem Entfernen des Blutzuckers dürfte demgemäß keine nennenswerte Bedeutung zukommen.

Weiter haben wir untersucht, ob eine Änderung in der Salzkonzentration der Durchspülungsflüssigkeit Bedeutung habe. Es war dies schon im Hinblick auf den Chlornatriumdiabetes notwendig, welcher beim Kaninchen durch Einleiten von 1 proz. NaCl Lösung in das Blut hervorgerufen wird.

Unsere Untersuchungen umfassen Durchspülungsversuche sowohl mit hypisotonischer als hyperisotonischer Kochsalzlösung, beide körperwarm. Die Ergebnisse der Durchspülung mit hypisotonischer Kochsalzlösung (0,1 proz. NaCl) sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle VIII.

Versuch-Nr.	Lebergewicht g	Gesamtglykogen g	Glykogen Proz.	Gesamtumsatz g	Umsatz Proz.
30	79	3,2	4,0	1,16	36,0
31	122	4,0	3,25	1,37	34,5
					35,3

Die Versuche zeigen, daß man bei Anwendung von 0,1 proz. Kochsalzlösung eine gewaltige Abnahme (durchschnittlich 35,5 Proz.) bekommt. Es ist aber nicht ganz sicher, daß in diesem Fall der ganze Umsatz von neugebildetem Leberenzym bewirkt ist. Bei Anwendung einer solchen hypisotonischen Lösung verändert man nämlich die osmotischen Verhältnisse der Leber in solchem Maße, daß man das Hineindiffundieren von Blutbestandteilen in die veränderten Leberzellen nicht bestimmt ausschließen kann. Es wäre also möglich, daß man von dem gefundenen Werte etwas abziehen muß. Trotzdem dürften die Versuche eine stark vermehrte Fermentproduktion anzeigen, und es fragt sich, ob die Durchspülung direkt

auf die Leber wirkt, oder die Wirkung indirekt durch Einwirkung auf das Nervensystem zustande kommt.

Um hierüber Aufklärung zu erhalten, haben wird Leberproben von Versuch Nr. 34 (Verblutung ohne Durchspülung), zum Teil wie gewöhnlich mit 0,8 proz., zum Teil mit 6,1 proz. und mit 1,2 proz. Kochsalzlösung versetzt. Wäre die Wirkung auf die Leber eine direkte, z. B. durch die Bildung des Enzyms aus einem Zymogen bedingte, so sollte in den Proben ein Unterschied zu bemerken sein. Dies war jedoch nicht der Fall, und man kann demgemäß als höchst wahrscheinlich annehmen, daß die Fermentproduktion infolge von Erregung des Zuckerzentrums durch die hypisotonische Kochsalzlösung eintritt.

Von Versuchen mit Durchspülung von hyperisotonischer 1,2 proz. Kochsalzlösung haben wir nur einen ausgeführt, weil er genau so ausgefallen ist, wie die Versuche der Tabelle V.

Tabelle IX.

Versuch-Nr.	Leber-gewicht g	Gesamt-glykogen g	Glykogen Proz.	Gesamt-umsatz g	Umsatz Proz.
32	96	5,88	6,12	0,78	13,3

Die hyperisotonische Kochsalzlösung bewirkte somit keine Fermentproduktion. Es liegt somit, wenn wir überhaupt aus einem Versuche Folgerungen ziehen dürfen, kein Grund vor, anzunehmen, daß es das Kochsalz ist, das die Erregung des Zuckerzentrums bewirkt, und wir befinden uns mit Naunyn in Übereinstimmung, wenn er die Ursache der Kochsalzglykosurie nur in der starken Diurese sucht, nicht aber mit E. Külz, der den Kochsalzdiabetes aus einer Reizung des nervösen Zuckerzentrums erklärt.

Es steht aber noch aus zu zeigen, daß nicht eine isotonische Salzlösung an sich die Fermentproduktion bewirkt. Dies haben wir zu beweisen versucht, indem wir die Fermentbildung nach Verblutung ohne Durchspülung untersuchten (Tab. X).

Die Versuche zeigen hier etwa dieselbe Fermentproduktion wie in den Durchspülungsversuchen, in beiden Fällen ungefähr die doppelte Fermentmenge gegenüber den Tieren, wo die Leber während des Lebens exstirpiert worden war (Tabelle I).

Als Erklärung dieser Hyperproduktion von Ferment darf man wahrscheinlich eine Reizung mit konstantem Ausschlag der Ferment-

Tabelle X.

Versuch-Nr.	Lebergewicht g	Gesamtglykogen g	Glykogen Proz.	Gesamtumsatz g	Umsatz Proz.
33	56[1]	2,7	4,6	0,358	13,3
34	123	13,7	11,1	1,948	14,3
					13,8

bildung annehmen, und zwar bedingt durch Sauerstoffmangel. Wenn dies aber richtig ist, muß auch Erstickung durch Luftmangel allein eine Überproduktion der Leberdiastase bewirken. In der Tat ist bekannt, daß Kohlenoxydvergiftung Glykosurie hervorruft. Leider verfügen wir nicht über Versuche mit Untersuchung des Leberferments nach CO-Vergiftung. Dagegen haben wir in einem Falle das Tier durch Sauerstoffentziehung vergiftet und dem sterbenden Tiere die Leber entnommen und untersucht.

Tabelle XI.

Versuch-Nr.	Lebergewicht g	Gesamtglykogen g	Glykogen Proz.	Gesamtumsatz g	Umsatz Proz.
35	110	6,8	6,24	1,23	18,0

Auch in diesem Falle ist eine ähnliche Hypersekretion des Leberenzyms vorhanden.

Aus diesen Versuchen folgt, daß die Ursache der Hypersekretion höchstwahrscheinlich in der Asphyxie zu suchen ist.

In sämtlichen Durchspülungsversuchen haben wir, wie erwähnt, körperwarme Kochsalzlösung (von 37° bis 38° C) benutzt, um nicht durch Einführung eines neuen Momentes die Ergebnisse zu komplizieren. Nachdem deren Einfluß klargestellt war, gingen wir daran, die Einwirkung kalter Kochsalzlösung zu untersuchen.

Diese Untersuchung verdiente nach unserer Auffassung eine besondere Beachtung. Es war zu erwarten, daß die Abkühlung an sich eine neue Anregung zur Zuckerproduktion geben dürfte. Wir wissen ja, daß der Stoffumsatz in der Kälte größer wird und

[1]) In den zwei Proben wurden je 20 g Leber zum Versuch genommen.

als Verbrennungsmaterial in erster Linie der Zucker in Betracht kommt. Eine vermehrte Verbrennung, welche vorzugsweise auf Kosten des Zuckers vor sich geht, muß eine vermehrte Zuckerproduktion in der Leber nach sich ziehen. Wenn sich eine solche nach der Durchspülung kalter Kochsalzlösung in der Leber findet, so zeigt dies: 1. daß das Nervensystem während der Durchspülung noch funktionsfähig war (denn es ist doch mindestens wahrscheinlich, daß diese vermehrte Zuckerproduktion der Leber eine reflektorische ist), und 2. daß die Erregung des Nervensystems eine so schnelle Fermentsekretion bewirkt, daß die unmittelbar folgende Leberexstirpation schon das fertig gebildete Ferment aufweist. Nach unseren Befunden, bei Durchspülung mit 0,1 proz. Kochsalzlösung, war dies nicht unwahrscheinlich. Wir geben die Resultate in der folgenden Tabelle an.

Tabelle XII.

Versuch-Nr.	Temperatur der Na Cl-Lösung °C	Leber-gewicht g	Gesamt-glykogen g	Glykogen Proz.	Gesamt-umsatz g	Umsatz Proz.
36	10	72	7,8	10,85	1,64	21,0
37	14	90	9,2	10,22	1,49	16,2
38	18	80	2,12	2,5	0,92	43,4
						26,9

Die Durchspülung mit kalter Kochsalzlösung bewirkt sonach eine unzweifelhafte Vergrößerung der Fermentproduktion.

Die Ergebnisse differieren untereinander sehr bedeutend. Inwieweit die Temperaturen diese Differenzen bewirkt oder andere Verhältnisse mitspielen (die Leber des Kaninchens Nr. 38 enthielt wenig Glykogen!), ist aus den wenigen Versuchen nicht zu ersehen. Die vielen übrigen Aufgaben, welche eine Beantwortung forderten, haben uns von einer weiteren Verfolgung dieser Frage abgehalten.

Die Versuche haben also das erwartete Resultat gegeben. Es ist interessant, wie überraschend schnell das Nervensystem auf Reizung mit veränderter Fermentproduktion reagiert, was wir hier der weiteren Untersuchungen wegen besonders hervorheben möchten.

Die Versuchsergebnisse dürften auch das Vorkommen des sogenannten „Kältediabetes“ erklären. Dieser verdankt demgemäß sein Auftreten der Reizung des Zuckerzentrums.

Es bleibt noch zu bemerken, daß wir durch besonders darauf gerichtete Versuche haben zeigen können, daß eine Einwirkung

der Kälte auf die exstirpierten Lebern an sich keine Fermentproduktion bewirkt.

Zur besseren Übersicht stellen wir zum Schluß unsere Versuchsergebnisse in Tabelle XIII zusammen.

Tabelle XIII.

	Gesamt-glykogen g	Gesamt-umsatz g	Umsatz Proz.
Normaltiere	12,6	0,77	6,3
Hungertiere	0,85 [3,50]	[0,43]	13,0
Durchspülung mit körperwarmer NaCl-Lösung	4,60	0,56	12,1
Durchspülung mit warmer 0,1 proz. NaCl-Lösung	3,60	1,27	35,3
Durchspülung mit warmer 1,2 proz. NaCl-Lösung	5,88	0,78	13,3
Durchspülung mit kalter NaCl-Lösung	6,40	1,01	26,9
Verblutung	8,20	1,15	13,8
Sauerstoffmangel	6,80	1,23	18,0

Die Ergebnisse sprechen für sich selbst und sind auch oben ausführlich erklärt worden.

Als das wichtigste Resultat unserer Untersuchungen ist hervorzuheben der geringe, ziemlich konstante Umsatz bei gutgenährten Tieren. Da die übrigen Versuche zu der Folgerung berechtigen, daß es in der Tat möglich ist, nach unserem Verfahren die intravitale Fermentproduktion zu bestimmen, liegt hiermit der Weg zur Erforschung der Bedeutung des Leberenzyms bei Diabetes offen. Wir besitzen auch hierüber ausgedehnte Untersuchungen, welche demnächst veröffentlicht werden sollen. Diese Untersuchungen sollen in drei weiteren Abhandlungen mitgeteilt werden, wovon die erste über den Glykogenumsatz nach verschiedenen nervösen Einwirkungen, die zweite über den Umsatz nach verschiedenen Vergiftungen und die dritte nach Pankreasexstirpation berichten soll.

Beiträge
zur
Chemischen Physiologie
und
Pathologie

Zeitschrift für die gesamte Biochemie

unter

Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben

von

Franz Hofmeister

o. Professor der physiologischen Chemie an der Universität Straßburg

---

IX. Band 12. Heft

(Ausgegeben Mai 1907)

Braunschweig

Druck und Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn

1907

Inhalt des 12. Heftes.

Die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie“ erscheinen in zwanglosen Heften, von denen 12 einen Band von etwa 30 Druckbogen zum Preise von M. 15,— bilden.

Die Ausgabe der Hefte erfolgt nach Maßgabe des einlaufenden Materials in kurzen Zwischenräumen. Die Zahl der in einem Jahre erscheinenden Bände soll zwei nicht überschreiten.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Straßburg i. E., Wimpfelingstraße 2, zu richten.

Bei der Aufnahme von Arbeiten in die „Beiträge“ soll in erster Reihe deren biologisches Interesse, sodann Exaktheit der Durchführung, Sachlichkeit, Knappheit und Übersichtlichkeit der Darstellung maßgebend sein. Polemische Ausführungen, welche den Rahmen einer tatsächlichen Richtigstellung überschreiten, können nicht Aufnahme finden. Der kurzen Mitteilung neuer Befunde bleibt ein besonderer Raum vorbehalten. Solchen „kürzeren Mitteilungen“ kann ein besonders rasches Erscheinen zugesichert werden.

Die Mitarbeiter erhalten ein Honorar von M. 40,— für den Druckbogen und 50 Sonder-Abzüge.

XXVIII.

Über Beziehungen der Lipoide zur Serumhämolyse.

Von Dr. **Fritz Dautwitz** und Dr. **Karl Landsteiner**.

Aus dem pharmakologischen Institut (Vorstand Geh. Rat Prof. H. Meyer) und dem pathologisch-anatomischen Institut (Vorstand Hofrat Prof. Dr. A. Weichselbaum) in Wien.

Durch frühere Untersuchungen sind wir dazu gelangt, den Lipoiden der roten Blutkörperchen eine für die Hämolyse durch Serum und Toxine wesentliche Bedeutung beizumessen. Nach unserer, von der üblichen Auffassung abweichenden Annahme erfolgt die Hämolyse in diesen Fällen durch eine Lockerung der die Integrität der Zellsubstanz bedingenden Vereinigung von Eiweiß und fettartigen Substanzen. Unsere Ansicht gründete sich namentlich auf die Herstellung einer kräftigen nach Art der Serumhämolysine wirkenden hämolytischen Kombination aus einer anorganischen kolloiden Säure und einem an und für sich nur in geringem Maße hämolysierenden Lipoid[1]). Durch die Untersuchungen von Pascucci[2]), der mit Hilfe von Hämotoxinen eine Lockerung künstlich hergestellter lipoider Membranen bewirken konnte, wurde unsere Annahme nachdrücklich bekräftigt, und Pascucci gelangt auf Grund dieser Befunde zu ganz ähnlichen Schlüssen wie wir. Wir hatten außerdem festgestellt, daß aus Erythrocyten sich mit Petroläther und Äther Substanzen extrahieren lassen, die antihämolytisch wirken[3]) und in einigen Fällen eine für lipoide Substanzen unerwartete spezifische Wirkung zeigen.

Nach den referierten Mitteilungen erschien eine Arbeit verwandten Inhalts von Bang und Forssman[4]). Diese Autoren

---

[1]) Landsteiner u. Jagic, Wiener klin. Wochenschr. 1904 u. Münch. med. Wochenschr. 1904.

[2]) Diese Beiträge 6, 543, 552

[3]) Landsteiner und v. Eisler, Wiener klin. Wochenschr. 1905 und Zentralbl. f. Bakteriol. 1905.

[4]) Diese Beiträge 8, 238 und Zentralbl. f. Bakteriol. 1906.

kamen bezüglich der hämolytischen Vorgänge zu Schlüssen, die in gewisser Beziehung den von uns und nachher von Pascucci geäußerten Annahmen nahestehen, insofern auch sie eine Bedeutung der Lipoidstoffe für die Hämolyse durch Serum supponieren. Bang und Forssman fanden nicht nur in den Ätherextrakten aus roten Blutkörperchen antihämolytische Stoffe, sondern sie berichten auch über die Bildung spezifischer Hämolysine durch Injektion von Ätherextrakten aus Erythrocyten und schließen, daß die die Hämolysinbildung anregende Substanz eine fettartige Beschaffenheit habe. Da nach Bang und Forssman die immunisierende Substanz nicht die Fähigkeit hat, den spezifischen hitzebeständigen Teil des Hämolysins zu binden, so ziehen die Autoren den Schluß, daß die immunisierende und die neutralisierende Substanz verschieden sind; es sei also durch ihre Versuche das in der Immunitätslehre bis jetzt anerkannte Prinzip, daß der Antikörper mit dem Antigen zu reagieren vermöge, durchbrochen. Was im besonderen die antihämolytische Wirkung anlangt, finden Bang und Forssman im Gegensatz zu unseren Angaben, daß die lipoiden antihämolytischen Stoffe nicht auf den hitzebeständigen Teil des Serums, sondern nur auf das sogenannte Komplement einwirken.

Die nun anzuführenden Versuche hatten den Zweck, die Kenntnis der antihämolytischen lipoidartigen Stoffe zu erweitern und womöglich die bestehenden Widersprüche aufzuklären.

1.

Während die Hemmung der Hämolyse durch Ätherextrakte aus Erythrocyten bei einer Anzahl von Kombinationen, z. B.:

Normales hämolytisches Serum von	Ätherextrakt aus	5 Proz. Blutaufschwemmung von
Huhn	Meerschweinchenblut Schweineblut Rinderblut Pferdeblut	Meerschweinchen Schwein Rind
Pferd	Meerschweinchenblut Schweineblut Pferdeblut Rinderblut	Meerschweinchen Schwein

zwar in verschieden hohem Grade nachweisbar, aber nicht merklich spezifisch war, so zeigten sich bei den Kombinationen:

Normales hämolytisches Serum von	Ätherextrakt aus	5 Proz. Blutaufschwemmung von
Kaninchen	Meerschweinchenblut Kaninchenblut Schweineblut Rinderblut Pferdeblut	Meerschweinchen Schwein
Schwein	Meerschweinchenblut Kaninchenblut Schweineblut Rinderblut Pferdeblut	Meerschweinchen Kaninchen

auch ungleich starke aber deutlich spezifische Hemmungserscheinungen.

Zur näheren Untersuchung des hemmenden Körpers nahmen wir eine Acetonfällung des Ätherextraktes vor.

Geschlagenes, dreimal mit 0,9 proz. Kochsalzlösung gewaschenes Blut wurde unter wiederholtem Umschütteln im Scheidetrichter im ganzen mit der sechs- bis achtfachen Menge Äther behandelt, der Äther durch sehr dichte Filter filtriert, zum größten Teile abdestilliert, der Rest bei Zimmertemperatur abdunsten gelassen und der Rückstand im Vakuum getrocknet. (Derselbe wird im folgenden als Blutextrakt bezeichnet.)

Die klare ätherische Lösung dieses Extraktes wurde mit Aceton im Überschuß versetzt, von dem sich bildenden Niederschlag nach 24 Stunden abfiltriert; der Niederschlag wieder in Äther gelöst, wobei eine geringe Menge ungelöst blieb, filtriert, abermals mit Aceton gefällt und die Fällung nach 24 stündigem Stehen abfiltriert. Das Filtrat nach der ersten Acetonfällung wurde mit dem der zweiten vereinigt, Äther und Aceton bis auf einen kleinen Teil abdestilliert, und der Rest bei gewöhnlicher Temperatur verdampfen gelassen. Man erhält eine glänzend weiße, kristallinische, aus Plättchen bestehende Masse. Der durch Aceton erzeugte Niederschlag wurde abermals in Äther aufgenommen, wobei wieder ein Teil ungelöst blieb; das klare Filtrat wurde mit 96 proz. Alkohol gefällt, der Niederschlag abfiltriert und der Alkohol auf dem Wasserbade verjagt. Durch nochmaliges Behandeln des Rückstandes mit Alkohol wurde noch ein in Alkohol unlöslicher geringer Teil entfernt. Der zur Trockne gebrachte Rest wird im folgen-

den als Acetonfällung (AF), der in Aceton lösliche Teil mit AL bezeichnet. Ersterer bildet eine bräunliche, zähe, nicht kristallinische Masse, die in Äther ziemlich leicht löslich ist und sich mit Wasser durch Verreiben leicht zu einer weißlichen, gleichmäßigen, trüben Emulsion bringen läßt. Die in Alkohol unlöslichen Portionen wurden nicht eingehender untersucht, da ihre antihämolytische Wirksamkeit im Vergleich zu der in Alkohol löslichen Fraktion viel geringer ist.

Die im folgenden näher bezeichnete Extraktmenge wurde immer zu 2 ccm Serum hinzugefügt, möglichst fein mit einem Platinspatel verteilt, die Mischung eine Stunde im Brutofen bei 37° C gelassen, dann filtriert und 10 Tropfen des Filtrates zum Versuche verwendet. Nach vollständiger Lösung eines Tropfens 5proz. Blutaufschwemmung wurde je ein weiterer zugegeben; beobachtet wurde durch 15 Minuten; die Eprouvetten befanden sich im Wasserbade bei 37°. Als Kontrolle dient das Serum ohne Zusatz.

Vergleich der hemmenden Wirkung des Ätherextraktes, der in Aceton löslichen und unlöslichen Fraktion.

1. Menge der zugesetzten Substanz: 0,0001 g.

a) Kaninchenserum — Schweineblut.

Kontrolle	7 Tropfen	teilweise gelöst
Schweineblutextrakt . .	1 „	nicht „
„ AF	1 „	„ „

b) Kaninchenserum — Meerschweinchenblut.

Kontrolle	7 Tropfen	gelöst
Schweineblutextrakt	5 „	„
„ AF	5 „	„

2. Menge der zugesetzten Substanz: 0,00002 g.

a) Kaninchenserum — Schweineblut.

Kontrolle	5 Tropfen	fast gelöst
Schweineblutextrakt . .	3 „	teilweise „
„ AF	1 „	nicht „

b) Kaninchenserum — Meerschweinchenblut.

Kontrolle	6 Tropfen	gelöst
Schweineblutextrakt	4 „	„
„ AF . .	3 „	fast „

3. Menge der zugesetzten Substanz: 0,000005 g.

a) Kaninchenserum — Schweineblut.

Kontrolle	8 Tropfen	gelöst
Schweineblutextrakt . .	4 „	teilweise „
„ AF	1—2 „	„

b) Kaninchenserum — Meerschweinchenblut.

Kontrolle	9 Tropfen	gelöst
Schweineblutextrakt	6 „	„
„ AF	6 „	„

4. Menge der zugefügten Substanz: 0,0005 g.

a) Kaninchenserum — Schweineblut.

Kontrolle	6 Tropfen	fast	komplett
Schweineblutextrakt	1 „	nicht	gelöst
„ AF	1 „	teilweise	„
„ AL	3 „	„	„
Pferdeblutextrakt	4 „	wenig	„
„ AF	6 „	fast	„
„ AL	5 „	teilweise	„

b) Kaninchenserum — Meerschweinchenblut.

Kontrolle	8 Tropfen		gelöst
Schweineblutextrakt	5 „		„
„ AF	5 „	fast	„
„ AL	5 „	teilweise	„
Pferdeblutextrakt	5 „	fast	„
„ AF	5 „		„
„ AL	5 „		„

5. Menge der zugefügten Substanz: 0,000 05 g.

a) Kaninchenserum — Schweineblut.

Kontrolle	10 Tropfen	gelöst
Schweineblutextrakt	4 „	„
„ AF	1—2 „	„
„ AL	7 „	„
Pferdeblutextrakt	9 „	„

b) Kaninchenserum — Meerschweinchenblut.

Kontrolle	7 Tropfen		gelöst
Schweineblutextrakt	6 „		„
„ AF	6 „	fast	„
„ AL	5 „		„
Pferdeblutextrakt	7 „	fast	„

6. Menge der zugefügten Substanz: 0,003 g.

a) Kaninchenserum — Schweineblut.

Kontrolle	4 Tropfen		gelöst
Schweineblutextrakt AF	1 „	nicht	„
„ AL	2 „	„	„
Pferdeblutextrakt AF	4 „	fast	„
„ AL	3 „	teilweise	„
Lecithin Agfa	2 „	fast	„

b) Kaninchenserum — Meerschweinchenblut.

Kontrolle	6 Tropfen	teilweise	gelöst
Schweineblutextrakt AF	4 „	„	„
„ AL	4 „	„	„
Pferdeblutextrakt AF	4 „	fast	„
„ AL	4 „	teilweise	„
Lecithin Agfa	4 „	fast	„

7. Menge der zugefügten Substanz: 0,007 g.

a) Kaninchenserum — Schweineblut.

Kontrolle	7 Tropfen	gelöst
Schweineblutextrakt AF . .	1 „	nicht „
„ AL . .	5 „	„
Pferdeblutextrakt AF	5 „	„
„ AL	5 „	„
Lecithin Agfa	5 „	„

b) Kaninchenserum — Meerschweinchenblut.

Kontrolle	6 Tropfen	gelöst
Schweineblutextrakt AF . .	5 „	teilweise „
„ AL . .	5 „	„ „
Pferdeblutextrakt AF . . .	6 „	„
„ AL . . .	6 „	„
Lecithin Agfa	6 „	„

8. Menge der zugefügten Substanz: 0,003 g.

a) Hühnerserum — Schweineblut.

Kontrolle	9 Tropfen	gelöst
Schweineblutextrakt	6 „	„
„ AF	5 „	„

b) Hühnerserum — Meerschweinchenblut.

Kontrolle	8 Tropfen	teilweise	gelöst
Schweineblutextrakt . .	6 „	„	„
„ AF	5 „	„	„

9. Menge der zugefügten Substanz: 0,0003 g.

a) Hühnerserum — Schweineblut.

Kontrolle	7 Tropfen	gelöst
Schweineblutextrakt	6 „	„
„ AF	6 „	„

b) Hühnerserum — Meerschweinchenblut.

Kontrolle	4 Tropfen	teilweise	gelöst
Schweineblutextrakt . .	3 „	„	„
„ AF	3 „	„	„

Wir teilen an dieser Stelle anhangsweise einige Versuche über Hemmung der Hämagglutination durch Blutkörperchenextrakte und fettartige Stoffe mit. Es zeigte sich eine solche Wirkungshemmung in den wenigen untersuchten Fällen einige Male bei Anwendung ebensowohl von Petroläther- wie von Ätherextrakten (vgl. dagegen Lazar, Wiener klinische Wochenschrift 1906, Nr. 19).

2 ccm inaktives normales Kaninchenserum wurden mit der angegebenen Substanzmenge eine Stunde im Brutofen belassen, filtriert und der Agglutinationstitre durch Auswertung der wirksamen Verdünnungsgrenze nach einstündigem Aufenthalt im Brutschrank bestimmt. Zur Titration dienen hier wie in den folgenden Versuchen, wenn keine andere Angabe gemacht ist, 0,5 ccm der Flüssigkeiten. Ablesung des Versuches nach 12 bis 14stündigem Stehen im Eisschrank.

Menge der zugesetzten Substanz: 0,001 g	Grenze der Wirksamkeit bei Verdünnung		
	0,05 ccm 5 proz. Meerschweinchenblut	0,05 ccm 5 proz. Schweineblut	0,05 ccm 5 proz. Hammelblut
Kontrolle	1/32	1/64	1/32
Meerschweinchenblut: Ätherextrakt	1/4	1/32	1/16
Meerschweinchenblut: Petrolätherextrakt	1/8	1/32	1/32
Schweineblut: Ätherextrakt	1/32	1/64	1/32
Schweineblut: Petrolätherextrakt	1/32	1/64	1/16
Hammelblut: Ätherextrakt	1/32	1/32	1/16
Hammelblut: Petrolätherextrakt	1/32	1/32	1/16

Menge der zugesetzten Substanz: 0,004 g	Grenze der Wirksamkeit bei Verdünnung		
	0,15 ccm 2 proz. Meerschweinchenblut	0,15 ccm 2 proz. Taubenblut	0,15 ccm 2 proz. Rinderblut
Kontrolle	1/8	1/64	1/1
Taubenblut: Petrolätherextrakt	1/4	1/64	1/1
Taubenblut: Ätherextrakt	1/4	1/64	1/2

Menge der zugesetzten Substanz: 0,02 g	Grenze der Wirksamkeit bei Verdünnung	
	0,15 ccm 2 proz. Meerschweinchenblut	0,15 ccm 2 proz. Schweineblut
Kontrolle	1/16	1/8
Ätherextrakt aus Pferdehirn	1/4	1/1
Benzolextrakt aus Schweinehirn	1/8	1/2
Lecithin Agfa	1/4	1/2
Lecithin aus Schweinehirn	1/4	1/1
Cholesterin	1/16	1/8
Chloroformextrakt aus Pferdehirn	1/2	1/1
Protagon aus Pferdehirn	1/16	1/8
Protagon aus Menschenhirn	1/8	1/4

Die Versuche über antihämolytische Wirkung zeigen, daß bei Verwendung gleichartigen Blutes und Extraktes der durch Aceton fällbare Teil der Extrakte eine beträchtlich stärkere antihämolytische Wirkung haben kann als der in Aceton lösliche Anteil. Die Wirkung des Acetonpräzipitates übertrifft meist merklich die des Gesamtextraktes. Die Hemmung wird in einigen Versuchen schon durch auffallend kleine Substanzmengen hervorgerufen und zeigt, wenn Meerschweinchen- und Schweineblut zum Versuche verwendet wird, deutliche Spezifizität. Es darf hingegen nicht übersehen werden, daß bei anderen Kombinationen (Hühnerserum — Meerschweinchen- und Schweineblut) die Hemmungswirkung des Extraktes, sowie der daraus dargestellten Fraktionen erstens beträchtlich geringer ist und zweitens keine deutliche Spezifizität hat.

Diesen unseren Resultaten widersprechen scheinbar die Ergebnisse von Bang und Forssman, die angeben, daß die antihämolytische Substanz der Ätherextrakte von roten Blutkörperchen in Aceton löslich ist, daß dagegen der in Aceton unlösliche Teil keine Neutralisationswirkung besitze. Außer diesem Widerspruch findet sich, wie schon erwähnt, noch ein zweiter zwischen den Angaben der genannten Autoren und den unseren [1]). Wir fanden eine Hemmungswirkung der Ätherextrakte auf den hitzebeständigen Teil des Serumhämolysins; Bang und Forssman finden abweichend von ihrer ursprünglichen Meinung, daß im Gegenteil das sogenannte Komplement unwirksam gemacht werde. Der Gegensatz erklärt sich, wie wir fanden, aus der Verschiedenheit der Bedingungen, unter denen die Versuche ausgeführt wurden. Wir führen im folgenden eine Widerholung des Versuches an, der seinerzeit mitgeteilt wurde [2]).

1. 1 ccm normales Rinderserum a. [3]) + 0,002 g Meerschweinchenblutextrakt. 1 ccm 0,9 proz. Kochsalzlösung.

2. 1 ccm normales Rinderserum a. + 0,002 g Meerschweinchenblutextrakt. 1 ccm aktives Meerschweinchenserum.

3. 1 ccm normales Rinderserum a. + 0,002 g Meerschweinchenblutextrakt. 1 ccm normales Rinderserum i. a. [4]).

4. 1 ccm normales Rinderserum i. a. + 0,002 g Meerschweinchenblutextrakt. 1 ccm 0,9 proz. Kochsalzlösung. 1 ccm aktives Meerschweinchenserum.

5. 1 ccm normales Rinderserum i. a. + 0,002 g Meerschweinchenblutextrakt. 2 ccm aktives Meerschweinchenserum.

---

[1]) l. c.
[2]) l. c.
[3]) a. = aktiv.
[4]) i. a. = inaktiv.

6. 1 ccm normales Rinderserum i. a. + 0,002 g Meerschweinchenblutextrakt. 1 ccm aktives Meerschweinchenserum. 1 ccm normales Rinderserum i. a.

Hierauf Bestimmung des Titers der einzelnen Proben durch Auswertung der wirksamen Verdünnungsgrenze.

	Mit 0,05 ccm 2,5 proz. Meerschweinchenblut
1.	1/8
2.	1/8
3.	1/16
4.	1/4
5.	1/4
6.	1/16
Norm. Rinderserum a.	1/16

Diese Versuche stimmen augenscheinlich vollkommen mit unseren früheren überein.

Wir gingen nun noch so vor, daß wir mit Extrakten versetzte inaktive Sera eine halbe Stunde auf eine bestimmte Menge 5 proz. Blutkörperchenaufschwemmung einwirken ließen, die Blutkörperchen dann dreimal mit 0,9 proz. Kochsalzlösung wuschen und sie nun mit aktivem Serum zusammenbrachten. Andererseits wurden die Blutkörperchen mit unvermischtem, inaktivem Serum behandelt, gewaschen und dann aktives, mit Ätherextrakten versetztes Serum zugefügt. Die Anordnung der Versuche ist die gleiche wie bei Bang und Forssman[1]).

	0,12 ccm 5 proz. Meerschweinchenblut	0,12 ccm 5 proz. Hammelblut
1. 0,5 ccm normales Kaninchenserum i. a. 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	komplett	komplett
2. 0,5 ccm normales Kaninchenserum i. a. + 0,0001 g Meerschweinchenblutextrakt 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	teilweise	komplett
3. 0,5 ccm normales Kaninchenserum 0,25 ccm Meerschweinchenserum a. + 0,0001 g Meerschweinchenextrakt	komplett	komplett
4. 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	0	0

[1]) In den folgenden Tabellen ist die Intensität der Hämolyse bzw. die stärkste noch wirksame Verdünnung angegeben. Der Zusatz von Extrakt zu einem Serum ist durch das + - Zeichen angezeigt. Digestionszeit der Sera mit den Extrakten hier und in den folgenden Versuchen 1/2 Stunde.

	0,14 ccm 5 proz. Meerschweinchenblut	0,14 ccm 5 proz. Hammelblut
1. 0,5 ccm normales Kaninchenserum i. a. . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	fast komplett	komplett
2. 0,5 ccm normales Kaninchenserum i. a. + 0,0002 g Meerschweinchenextrakt . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	Spur gelöst	komplett
3. 0,5 ccm normales Kaninchenserum i. a. . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a. + 0,0002 g Meerschweinchenblutextrakt	fast komplett	komplett
4. 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	0	0

	0,20 ccm 5 proz. Hammelblut	0,10 ccm 5 proz. Meerschweinchenblut	0,20 ccm 5 proz. Schweineblut
1. 0,5 ccm norm. Kaninchenserum i. a. 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	komplett	fast komplett	komplett
2. 0,5 ccm normales Kaninchenserum i. a. + 0,001 g Hammelblutextrakt . . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	0	fast komplett	komplett
3. 0,5 ccm norm. Kaninchenserum i. a. 0,25 ccm Meerschweinchenserum a. + 0,001 g Hammelblutextrakt	komplett	fast komplett	komplett
4. 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	0	0	0

	0,20 ccm 5 proz. Hammelblut	0,34 ccm 5 proz. Schweineblut
1. 0,5 ccm 1/2 normales Kaninchenserum i. a. . 0,25 ccm 1/2 Meerschweinchenserum a.	komplett	komplett
2. 0,5 ccm 1/2 normales Kaninchenserum i. a. + 0,001 g Hammelblutextrakt . . . . . 0,25 ccm 1/2 Meerschweinchenserum a.	0	komplett
3. 0,5 ccm 1/2 normales Kaninchenserum i. a. . 0,25 ccm 1/2 Meerschweinchenserum a. + 0,001 g Hammelblutextrakt	komplett	komplett
4. 0,25 ccm 1/2 Meerschweinchenserum a. . . .	0	0

Auch diese Methode zeigt also, daß die Einwirkung der Ätherextrakte aus Erythrocyten den hitzestabilen Teil des Hämolysins betrifft.

Die Differenz zwischen diesen Ergebnissen und denen von Bang und Forssman konnte nun darauf beruhen, daß diese Autoren nicht wie wir mit normalem, sondern vermutlich nur mit Immunserum gearbeitet haben und, wie es scheint, auf Grund der Ehrlichschen Theorie ohne weiteres die Identität der wirksamen Substanzen in diesen beiden Arten von Serum annehmen. Diese Voraussetzung dürfte auch im vorliegenden Falle nicht zutreffen[1]. Wir fanden wirklich beim Vergleich der Einwirkung der Extrakte auf Normal- und Immunserum ungleiche Effekte.

	0,05 ccm 5proz. Meerschweinchenblut	0,05 ccm 5proz. Schweineblut
Normales Kaninchenserum a.	$> 1/16$	$1/4$
Normales Kaninchenserum a. + 0,003 g Meerschweinchenblutextrakt	$1/2$	$1/2$
Normales Kaninchenserum a. + 0,003 g Schweineblutextrakt	$1/2$	$1/1$
Normales Kaninchenserum a. + 0,003 g Rinderblutextrakt	$1/8$	$1/2$
$1/40$ Kaninchen-Meerschweinchenimmunserum a.	$1/20$	$1/2$
$1/40$ Kaninchen-Meerschweinchenimmunserum a. + 0,003 g Meerschweinchenblutextrakt	$1/10$	$1/1$
$1/40$ Kaninchen-Meerschweinchenimmunserum a. + 0,003 g Schweineblutextrakt	$1/10$	$1/1$
$1/40$ Kaninchen-Meerschweinchenimmunserum a. + 0,003 g Rinderblutextrakt	$1/10$	$1/1$

	0,05 ccm 2,5proz. Meerschweinchenblut	0,05 ccm 2,5proz. Schweineblut
Normales Kaninchenserum i. a. 0,05 ccm Meerschweinchenserum a.	$1/16$	$> 1/32$
Normales Kaninchenserum i. a. + 0,003 g Meerschweinchenblutextrakt. 0,05 ccm Meerschweinchenserum a.	0	$> 1/32$

[1] Über andere Fälle von Verschiedenheit zwischen Normal- und Immunserum handeln unsere Mitteilungen Zentralbl. f. Bakteriol. 39, 712, sowie Sitzungsber. d. freien Vereinigung f. Mikrobiologie 1906 zu Berlin.

	0,05 ccm 2,5 proz. Meerschweinchenblut	0,05 ccm 2,5 proz. Schweineblut
Normales Kaninchenserum i. a. + 0,003 g Schweineblutextrakt. 0,05 ccm Meerschweinchenserum a.	$^1/_{16}$	0
Normales Kaninchenserum i. a. + 0,003 g Rinderblutextrakt. 0,05 ccm Meerschweinchenserum a.	$^1/_{16}$	$> ^1/_{32}$
0,05 ccm Meerschweinchenserum a.	0	0
$^1/_{160}$ Kaninchen - Meerschweinchenimmunserum i. a. 0,05 ccm Meerschweinchenserum a.	$^1/_{16}$	$> ^1/_{32}$
$^1/_{160}$ Kaninchen - Meerschweinchenimmunserum i. a. + 0,003 g Meerschweinchenblutextrakt. 0,05 ccm Meerschweinchenserum a.	$^1/_8$	$> ^1/_{32}$
$^1/_{160}$ Kaninchen - Meerschweinchenimmunserum i. a. + 0,003 g Schweineblutextrakt. 0,05 ccm Meerschweinchenserum a.	$^1/_8$	$> ^1/_{32}$
$^1/_{160}$ Kaninchen - Meerschweinchenimmunserum i. a. + 0,003 g Rinderblutextrakt. 0,05 ccm Meerschweinchenserum a.	$^1/_8$	$> ^1/_{32}$

	0,10 ccm 5 proz. Rinderblut
$^1/_{50}$ Kaninchen - Rinderimmunserum i. a. + 0,05 ccm Meerschweinchenserum a.	$^1/_8$ deutlich
$^1/_{50}$ Kaninchen-Rinderimmunserum i. a. + 0,003 g Schweineblutextrakt. 0,05 ccm Meerschweinchenserum a.	$^1/_8$ schwach
$^1/_{50}$ Kaninchen - Rinderimmunserum i. a. + 0,003 g Pferdeblutextrakt. 0,05 ccm Meerschweinchenserum a.	$^1/_8$ "
$^1/_{50}$ Kaninchen - Rinderimmunserum i. a. + 0,003 g Rinderblutextrakt. 0,05 ccm Meerschweinchenserum a.	$^1/_8$ "
$^1/_{50}$ Kaninchen-Rinderimmunserum i. a. + 0,003 g Schweineblutextrakt AF. 0,05 ccm Meerschweinchenserum a.	$^1/_8$ deutlich
$^1/_{50}$ Kaninchen - Rinderimmunserum i. a. + 0,003 g Pferdeblutextrakt AF. 0,05 ccm Meerschweinchenserum a.	$^1/_8$ "
$^1/_{50}$ Kaninchen - Rinderimmunserum i. a. + 0,003 g Rinderblutextrakt AF. 0,05 ccm Meerschweinchenserum a.	$^1/_8$ "
$^1/_{50}$ Kaninchen - Rinderimmunserum i. a. + 0,003 g Rinderblutextrakt AL. 0,05 ccm Meerschweinchenserum a.	$^1/_8$ schwach
0,05 ccm Meerschweinchenserum a.	0

Diese Versuche und eine Anzahl anderer ähnlicher, die wir ausführten, lassen erkennen, daß in Fällen, wo die hämolytische Wirkung des Normalserums durch die Ätherextrakte aus roten Blutkörperchen sehr stark beeinflußt wird, die Wirkung auf das Immunserum desselben Tieres eine erheblich geringere sein kann. Es ist daher nicht geraten, die am Immunserum gewonnenen Resultate auf die analogen Verhältnisse beim normalen Serum direkt zu übertragen und umgekehrt. Darauf deuten auch die folgenden Resultate hin.

	0,12 ccm 5proz. Meerschweinchenblut
1. 0,5 ccm normales Kaninchenserum i. a. . . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	sehr stark
2. 0,25 ccm Kaninchen - Meerschweinchenimmunserum i. a. $^1/_{160}$ . . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	sehr stark
3. 0,5 ccm normales Kaninchenserum i. a. + 0,0005 g Meerschweinchenblutextrakt . . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	0
4. 0,25 ccm $^1/_{160}$ Kaninchen - Meerschweinchenimmunserum i. a. + 0,0005 g Meerschweinchenblutextrakt . . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	sehr stark
5. 0,25 ccm $^1/_{160}$ Kaninchen - Meerschweinchenimmunserum i. a. . . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a. + 0,0005 g Meerschweinchenblutextrakt	stark
6. 0,25 ccm Meerschweinchenserum	0

	0,12 ccm 5proz. Meerschweinchenblut
1. 0,25 ccm normales Kaninchenserum i. a. . . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	sehr stark
2. 0,5 ccm normales Kaninchenserum i. a. . . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	sehr stark
3. 0.12 ccm $^1/_{160}$ Kaninchen-Meerschweinchenimmunserum i. a. 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	sehr stark
4. 0,25 ccm normales Kaninchenserum i. a. + 0,0005 g Meerschweinchenblutextrakt . . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	0

	0,12 ccm 5 proz. Meerschweinchenblut
5. 0,5 ccm normales Kaninchenserum i. a. + 0,0005 g Meerschweinchenblutextrakt . . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	0
6. 0,12 ccm $^{1}/_{160}$ Kaninchen - Meerschweinchenimmunserum i. a. + 0,0005 g Meerschweinchenblutextrakt . . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	sehr stark
7. 0,5 ccm normales Kaninchenserum i. a. . . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a. + 0,0005 g Meerschweinchenblutextrakt	deutlich
8. 0,12 ccm $^{1}/_{160}$ Kaninchen - Meerschweinchenimmunserum i. a. . . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a. + 0,0005 g Meerschweinchenblutextrakt	schwach
9. 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	0

	0,06 ccm 5 proz. Meerschweinchenblut
1. 0,5 ccm normales Kaninchenserum i. a. . . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	fast komplett
2. 1,0 ccm normales Kaninchenserum i. a. . . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	fast komplett
3. 0,25 ccm $^{1}/_{160}$ Kaninchenimmunserum i. a. . . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	fast komplett
4. 0,5 ccm normales Kaninchenserum i. a. + 0,0005 g Meerschweinchenblutextrakt . . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	0
5. 1,0 ccm normales Kaninchenserum i. a. + 0,0005 g Meerschweinchenblutextrakt . . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	0
6. 0,25 ccm $^{1}/_{160}$ Kaninchenimmunserum i. a. + 0,0005 g Meerschweinchenblutextrakt . . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	fast komplett
7. 1,0 ccm normales Kaninchenserum i. a. . . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a. + 0,0005 g Meerschweinchenblutextrakt	0
8. 0,25 ccm $^{1}/_{160}$ Kaninchenimmunserum i. a. . . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a. + 0,0005 g Meerschweinchenblutextrakt	Spur
9. 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	0

Wirklich finden wir somit nur beim Normalserum die Wirkung auf den hitzebeständigen Teil des Serumhämolysins; beim Immunserum hingegen ergibt sich ebenso wie in den Versuchen von Bang und Forssman kein auffallender Effekt. Dagegen ist beim Immunserum eine merkliche Hemmungswirkung der Extrakte gegenüber dem Komplement vorhanden, und eine solche Hemmungswirkung findet sich in manchen Versuchen bei Verwendung geeigneter Extraktmengen auch beim normalen Serum, nur bleibt sie in der Regel weit hinter der anderen Hemmungswirkung auf den thermostabilen Teil des Hämolysins zurück.

Die eben mitgeteilten Erfahrungen veranlaßten uns, zu untersuchen, ob die beiden verschiedenen Hemmungswirkungen von einer oder von verschiedenen Substanzen hervorgerufen werden, wie es nach den Ergebnissen von Bang und Forssman und von uns den Anschein hat. Die Vermutung bestätigte sich.

	0,12 ccm 5 proz. Meerschweinchenblut	0,15 ccm 5 proz. Schweineblut
1. 0,5 ccm normales Kaninchenserum i. a. . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	fast komplett	komplett
2. 0,5 ccm norm. Kaninchenserum i. a. + 0,001 g Meerschweinchenblutextrakt . . . . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	0	komplett
3. 0,5 ccm normales Kaninchenserum i. a. . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a. + 0,001 g Meerschweinchenblutextrakt	stark	fast komplett
4. 0,5 ccm norm. Kaninchenserum i. a. + 0,001 g Meerschweinchenblutextrakt AF . . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	schwach	komplett
5. 0,5 ccm normales Kaninchenserum i. a. . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a. + 0,001 g Meerschweinchenblutextrakt AF	sehr stark	komplett
6. 0,5 ccm norm. Kaninchenserum i. a. + 0,001 g Meerschweinchenblutextrakt AL . . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	stark	komplett
7. 0,5 ccm normales Kaninchenserum i. a. . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a. + 0,001 g Meerschweinchenblutextrakt AL	0	schwach
8. 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	0	0

	0,10 ccm 5 proz. Meerschweinchenblut	0,10 ccm 5 proz. Schweineblut
1. 0,5 ccm normales Kaninchenserum i. a. . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	fast komplett	sehr stark
2. 0,5 ccm norm. Kaninchenserum a. + 0,004 g Schweineblutextrakt AL . . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	fast komplett	sehr stark
3. 0,5 ccm normales Kaninchenserum a. . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a. + 0,004 g Schweineblutextrakt AL	teilweise	0
4. 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	0	0

	0,20 ccm 5 proz. Schweineblut	0,10 ccm 5 proz. Meerschweinchenblut
1. 0,5 ccm normales Kaninchenserum i. a. . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	komplett	teilweise
2. 0,5 ccm norm. Kaninchenserum i. a. + 0,001 g Schweineblutextrakt . . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	teilweise	teilweise
3. 0,5 ccm normales Kaninchenserum i. a. . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a. + 0,001 g Schweineblutextrakt	fast komplett	teilweise
4. 0,5 ccm norm. Kaninchenserum i. a. + 0,001 g Schweineblutextrakt AF . . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	teilweise	teilweise
5. 0,5 ccm normales Kaninchenserum i. a. . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a. + 0,001 g Schweineblutextrakt AF	komplett	teilweise
6. 0,5 ccm norm. Kaninchenserum i. a. + 0,001 g Schweineblutextrakt AL . . . . 0,25 ccm Meerschweinchenserum a.	komplett	teilweise
7. 0,5 ccm norm. Kaninchenserum i. a. + 0,001 g Schweineblutextrakt AL	fast komplett	teilweise
8. 0,25 ccm Meerschweinchenserum	0	0

Danach verhalten sich die Hemmungswirkungen der Extrakte so, daß der durch Aceton fällbare Teil auf die hitzebeständige Komponente normaler Serumhämolysine wirkt, nicht aber der Immunhämolysine (Bang und Forssman). Hingegen hemmt der bei der Acetonfällung nicht niedergeschlagene Teil der Extrakte den Effekt des sogenannten Komplements (und zwar sowohl bei Normal- als bei Immunseren). Dieser Effekt ist im

Falle der normalen Sera meist beträchtlich geringer als der durch die andere Fraktion des Extraktes bewirkte. Bei Betrachtung der Fälle, wo bei Zusatz der Acetonfällung scheinbar eine starke Einwirkung auf das Komplement stattfindet, ist zu berücksichtigen, daß eine Hemmung auch erzielt wird durch Zusatz des Extraktes in 0,9 proz. Kochsalzlösung zu den schon mit Hämolysin beladenen Blutkörperchen und nachfolgendes Waschen derselben; diese Erscheinung kann daher wahrscheinlich zum Teil als eine Einwirkung auf das schon an Blutkörperchen fixierte Hämolysin erklärt werden.

2.

Wie schon berichtet wurde, vermochten Bang und Forssman durch Injektion von Ätherextrakten roter Blutkörperchen spezifische Hämolysinbildung anzuregen; wir können diese Angabe bestätigen. Zwei Kaninchen wurden mit einem durch Ausschütteln von gewaschenen Rinderblutkörperchen mit Äther hergestellten Extrakt dreimal in Abständen von etwa 10 Tagen intraperitoneal injiziert und erhielten im ganzen etwa 0,2 g des Extraktes. Der Titer ihres Serums, das vorher Rinderblut nicht löste, betrug nach den Injektionen 1 : 120 (bei beiden Tieren). (Ein zu gleicher Zeit zweimal mit den gewaschenen Blutkörperchen aus je 10 ccm Rinderblut injiziertes Kaninchen zeigte einen Titer von 1 : 1000.)

Hier wie bei den folgenden Auswertungen wurde eine Reihe von Verdünnungen des inaktiven Serums (0,5 ccm) mit 0,05 ccm aktivem Meerschweinchenserum und 0,05 ccm 5 proz. Rinderblutaufschwemmung versetzt, eine Stunde in den Brutofen gestellt und nach 12 stündiger Aufbewahrung in der Kälte abgelesen.

Es wurde nun der Ätherextrakt von Rinderblut in der oben beschriebenen Weise mit Aceton mehrmals gefällt und umgefällt und der lysinogene Effekt der beiden Fraktionen untersucht. Mit drei intraperitonealen Injektionen wurden im ganzen 0,05 g von jeder der beiden Substanzen zwei Tieren verabreicht. Der hämolytische Titer des Blutserums betrug nach der Behandlung mit dem in Aceton unlöslichen Teil 1 : 400, bei dem anderen Tiere 1 : 20; danach würde die lysinogene Substanz durch Aceton ausgefällt werden. Wir haben diesen Befund nicht durch weitere Versuche bekräftigt, da er vollkommen mit den Angaben von Bang und Forssman übereinstimmt.

In einer Reihe anderer Versuche wollten wir vergleichen, wie sich die lysinogene Wirkung von entfetteten Stromata zu der der extrahierten fettartigen Substanzen verhält. Wir stellten das Material

nach einem Verfahren her, das sich uns für die Darstellung von Blutkörperchenstromata zu manchen Zwecken gut bewährt hat.

500 ccm frisches, geschlagenes Rinderblut wurde mit 150 ccm Toluol versetzt, im Scheidetrichter 15′ bis 20′ stark geschüttelt und absetzen gelassen; nach ein bis drei Tagen bildet sich eine obere rosarote Schicht, die aus einem Magma von Blutkörperchen mit Toluol besteht und gegen die untere wässerige, tiefdunkelrote Schicht scharf abgegrenzt ist. Diese wird abgelassen, und das Magma durch wiederholtes Schütteln mit größeren Wassermengen und Absetzenlassen vom Blutfarbstoff gereinigt. Das obenaufschwimmende Magma ist nach gehöriger Waschung rein weiß. Nachdem die untere Schicht abgelassen ist, versetzt man die Emulsion mit einem Gemisch von 300 ccm Äther und 150 ccm Alkohol und schüttelt kräftig um; es bildet sich nun eine aus größeren braunen Flocken bestehende untere Schicht; das Gemisch von Äther-Alkohol ist lichtgelb gefärbt und wird abgehoben. Für den vorliegenden Zweck wurden die Stromata noch zweimal einige Tage hindurch mit der Äther-Alkoholmischung behandelt, dann von der Flüssigkeit getrennt und in 0,9 proz. Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Die Stromata werden auf diese Weise als wenig gefärbte, flockige Suspension erhalten. Mit dieser Aufschwemmung wurden Kaninchen injiziert und parallel dazu andere mit der Aufschwemmung der Abdampfrückstände der Toluol-Äther-Alkoholextrakte. Die Tiere erhielten zweimal Mengen der Substanzen intraperitoneal, die 2 ccm des ursprünglichen Blutvolumens entsprachen, bei einer dritten Injektion Mengen entsprechend 10 ccm Blut. Im folgenden sind die Titerwerte der hämolytischen Wirksamkeit des Serums dieser Tiere angegeben.

a) Injektion von Extrakten.

	Vor der Injektion	7 Tage nach der ersten Injektion[1]	10 Tage nach der zweiten Injektion[2]	14 Tage nach der dritten Injektion
Kaninchen Nr. I . .	1/2	1/16	1/16	1/32
„ „ II . .	1/1	1/4	1/4	0
„ „ III .	1/1	0	1/4	1/32
„ „ IV .	1/1	1/16	1/32	†

[1]) Hierauf zweite Injektion.
[2]) Hierauf dritte Injektion.

b) Injektion mit Stromata.

	Vor der Injektion	7 Tage nach der ersten Injektion [1])	10 Tage nach der zweiten Injektion [2])	14 Tage nach der dritten Injektion
Kaninchen Nr. V . .	1/4	1/4	1/4	1/256
„ „ VI .	1/1	1/16	1/1028	†
„ „ VII .	1/1	1/64	1/512	†
„ „ VIII .	1/1	1/16	1/512	1/2048

Bei dieser Versuchsanordnung zeigen sich die Extrakte von viel geringerer lysinogener Wirksamkeit als die Stromata. Die Versuche können aber nicht direkt mit denen von Bang und Forssman verglichen werden, da die Extrakte nicht nach dem von ihnen geübten Verfahren dargestellt wurden. Wir haben deshalb auch nach dieser Methode, nämlich durch Ätherextraktion der gewaschenen Rinderblutkörperchen, Extrakte dargestellt und ihre immunisierende Wirksamkeit mit der der übrigbleibenden Stromata verglichen.

a) Injektion von Extrakten.

	Vor der Injektion	9 Tage nach der ersten Injektion [3])	14 Tage nach der zweiten Injektion
Kaninchen Nr. IX	1/1	1/64	1/4000
„ „ X	1/1	1/256	1/2000
„ „ XI	1/2	1/64	†

b) Injektion von Stromata.

	Vor der Injektion	9 Tage nach der ersten Injektion [3])	14 Tage nach der zweiten Injektion
Kaninchen Nr. XII	1/1	1/4000	†
„ „ XIII	1/4	1/256	1/2000
„ „ XIV	1/1	1/1024	†
„ „ XV	1/2	1/1024	†

[1]) Hierauf zweite Injektion.
[2]) Hierauf dritte Injektion.
[3]) Hierauf zweite Injektion.

Diese Versuche ergaben ein für die immunisierende Wirkung der Extrakte beträchtlich günstigeres Resultat als die frühere Reihe; immerhin ist aber auch hier nicht ein Prävalieren der Wirksamkeit der extrahierten Fettsubstanzen nachweisbar gewesen. Die Ätherextraktion wurde durch öfter wiederholtes Schütteln im Scheidetrichter während eines Zeitraumes von acht Tagen mit mehrmals erneuertem Äther vorgenommen.

Bang und Forssman nehmen an, daß die immunisierenden Substanzen Lipoide sind und gründen diese Ansicht auf die von ihnen untersuchten Löslichkeitsverhältnisse der lysinogenen Substanz. Danach sind diese Stoffe im Gemenge mit den übrigen extrahierten Fettstoffen in Äther leicht löslich und aus demselben durch Aceton fällbar, nach der Reinigung (durch Acetonausfällung) aber in Äther, Aceton, kaltem und heißem Alkohol verschiedener Konzentration und in Essigäther unlöslich, aber löslich in kochendem Benzol. Uns scheint es zweifelhaft, ob man berechtigt ist, aus diesen Löslichkeitseigenschaften den Schluß zu ziehen, es seien die immunisierenden Körper lipoidartige. Dazu kommt, daß schon äußerst geringe Mengen des immunisierenden Stoffes durch die so empfindliche Immunisierungsreaktion nachgewiesen werden können[1]. Wir erinnern bei dieser Gelegenheit an die eigentümliche Erscheinung, die oben anläßlich der Stromadarstellung erwähnt wurde, daß nämlich beim Schütteln des Blutes mit Toluol die ganzen Stromata in der Toluolschicht bleiben, also offenbar leicht von fettlösenden Flüssigkeiten durchtränkt werden können. Auf eine mögliche Fehlerquelle weist ein Versuch von Bang und Forssman selbst hin, in dem sie fanden, daß eine Löslichkeit ihrer Substanz in heißem Essigäther durch Entstehen einer feinen Emulsion vorgetäuscht wird. Es wäre möglich, daß unter Umständen eine derartige feine Emulsion schwer von einer echten Lösung zu unterscheiden ist.

Wenn wir die Lipoidnatur der von Bang und Forssman in den Extrakten gefundenen immunisierenden Substanzen nicht für erwiesen halten, so kann andererseits die Frage gestellt werden, ob die besprochenen, die Hämolyse hemmenden Substanzen, den Lipoiden zugehören. Bezüglich der auf das Komplement wirkenden Stoffe liegt nach den Verhältnissen ihrer Löslichkeit aller Grund vor, sie den fettartigen zuzusetzen. Es ist dies um so weniger zu bezweifeln, als auch eine Anzahl wohl charakterisierter

[1]) Vgl. Friedberger und Dorner, Zentralbl. f. Bakteriol. 38, 544.

fettartiger Stoffe — Protagon und Cholesterin — ähnliche Effekte haben[1]). Aber auch für die in Aceton unlösliche hemmende Substanz scheint uns diese Annahme, daß sie ein Lipoid oder in fester Verbindung mit fettartigen Stoffen ist, immer noch die wahrscheinlichste. Dafür spricht der Umstand, daß der betreffende Körper auch nach mehrmaligem Umfällen mit Aceton aus Ätherlösung nicht an Wirksamkeit verliert und im Gegensatz zur lysinogenen Substanz immer noch leicht in Äther und anderen organischen Solvenzien löslich ist. Daß die hemmende Wirkung lipoidartigen Stoffen selbst zukommen kann, dafür dürfte auch die oben erwähnte in vielen Fällen nicht nachweisbare Spezifizität der hemmenden Wirkung anzuführen sein. Beispiele nicht deutlich spezifischer Wirkung der hemmenden Stoffe lassen wir hier folgen.

	Letzte noch wirksame Verdünnung u. Grad der durch diese hervorgerufenen Hämolyse von 0,10 ccm 5 proz. Rinderblut
Hühnerserum aktiv	1/4 komplett
" a. + 0,001 g Schweineblutextrakt .	1/2 Spur
" a. + 0,001 g Pferdeblutextrakt . .	1/2 schwach
" a. + 0,001 g Rinderblutextrakt . .	1/2 teilweise
" a. + 0,001 g Schweineblutextrakt AF	1/2 Spur
" a. + 0,001 g Pferdeblutextrakt AF .	1/4 Spur
" a. + 0,001 g Rinderblutextrakt AF .	1/2 Spur
" a. + 0,001 g Rinderblutextrakt AL .	1/2 schwach
Hühnerserum aktiv	1/2 sehr stark
" a. + 0,0005 g Schweineblutextrakt AF	1/2 schwach
" a. + 0,0005 g Pferdeblutextrakt AF	1/2 schwach
" a. + 0,0005 g Rinderblutextrakt AF	1/1 teilweise
Hühnerserum aktiv	1/2 fast komplett
" a. + 0,003 g Schweineblutextrakt .	1/2 Spur
" a. + 0,003 g Pferdeblutextrakt . .	1/2 komplett
" a. + 0,003 g Rinderblutextrakt . .	1/2 Spur

[1]) Vgl. Zentralbl. f. Bakteriol. 42, 353 (1906). Mit Rücksicht auf diesen Umstand, ferner die komplementartige Wirkung von Lecithin und anderen fettartigen Stoffen (vgl. Noguchi), dann die leichte Zerstörbarkeit des Komplementes durch fettlösende Mittel, dürfte übrigens die Vermutung, daß das Komplement den Lipoiden nahe steht — etwa eine Lipoid-Eiweißverbindung sei —, eine gewisse Wahrscheinlichkeit für sich haben.

	Letzte noch wirksame Verdünnung u. Grad der durch diese hervorgerufenen Hämolyse von 0,10 ccm 5 proz. Rinderblut
Hühnerserum a. + 0,003 g Schweineblutextrakt AF	1/2 Spur
„ a. + 0,003 g Pferdeblutextrakt AF .	1/2 „
„ a. + 0,003 g Rinderblutextrakt AF .	1/2 „
„ a. + 0,003 g Rinderblutextrakt AL .	1/2 schwach

Im gleichen Sinne, wie die eben angeführten Momente, ist es auch zu verwerten, daß der hemmende Stoff auch die hämolytische Wirkung artgleichen Serums neutralisiert.

XXIX.

Über die physiko-chemischen Verhältnisse und die Harnsekretion bei Hühnern.

Experimentelle Untersuchungen.

Von Dr. **Gennaro d'Errico**, Assistent des Instituts.

Aus dem physiologischen Institut der Kgl. Universität Neapel, unter Leitung von Prof. Fil. Bottazzi.

---

1. Ziel der Arbeit.

Die vorliegenden Untersuchungen, die auf Anraten des Herrn Prof. Fil. Bottazzi angestellt wurden, hatten zum Ziel, die verschiedenen Mechanismen der Regulierung des osmotischen Druckes in den tierischen Flüssigkeiten zu erklären.

Bekannt ist die Bedeutung der Nierenfunktion für die Regulierung des osmotischen Druckes des Blutes bei den Säugetieren. Wir wissen jedoch nicht, welche Bedeutung der von demselben Gesichtspunkte aus betrachteten Nierenfunktion der Vögel[1]) beigelegt werden kann, da ja bekanntlich der größte Teil der organischen Bestandteile des Urins der Vögel in Form von sehr wenig löslichen Körpern ausgeschieden wird. Meine Untersuchungen verfolgten den Zweck, diese Lücke auszufüllen. Sie bestehen:

1. in einem systematischen Studium der physiko-chemischen Eigenschaften des normalen Urins der Vögel im Vergleich mit denjenigen des Blutes;

2. im Studium der Harnsekretion bei Vögeln, bei denen der osmotische Druck des Blutes künstlich (vermittelst intravaskulärer Injektionen von hypertonischen und hypotonischen Kochsalzlösungen) erhöht oder vermindert worden war.

3. An diese beiden Reihen von fundamentalen Untersuchungen glaubte ich weitere anknüpfen zu müssen bezüglich der Leistung

---

[1]) Cfr. Milroy, T. H. The formation of uric acid in birds. Journ. of Physiol. 1903, Vol. XXX, No. 1.

des Darmrohres bei der Regulierung des osmotischen Druckes der inneren Flüssigkeiten.

Die Wichtigkeit derartiger Untersuchungen kann keinem Zweifel unterliegen, wenn man, wie schon oben bemerkt, in Betracht zieht, daß die stickstoffhaltigen Bestandteile des Vogelharns im Gegensatz zu denen des Säugetierharns aus größtenteils nicht gelösten Stoffen bestehen, die ihm das charakteristische trübe Aussehen verleihen. Eine andere Eigentümlichkeit der Urinsekretion der Vögel besteht in der sehr geringen Menge von Wasser, welche diese Tiere unter normalen Bedingungen durch die Nieren ausscheiden, eine Erscheinung, die die äußere Beschaffenheit des Harns wesentlich mitbestimmt; denn es ist einleuchtend, daß, wenn mehr Wasser ausgeschieden würde, ein größerer Teil der harnsauren Salze in Lösung bliebe.

2. Technisches Verfahren.

Als Versuchstiere verwendete ich gewöhnlich Hühner von 2 bis 3 kg.

Nur bei zwei Experimenten benutzte ich frisch gefangene Kiebitze (Vanellus vulgaris), da ich auch mit fleischfressenden Vögeln experimentieren wollte, d. h. mit solchen, die nicht mit der Nahrung große Mengen von Kalisalzen zu sich nehmen[1]).

Aus leicht verständlichen technischen Gründen zog ich es vor, die Blutproben, welche zu den physiko-chemischen Untersuchungen dienen sollten, dem peripheren Stumpfe der V. jugularis zu entnehmen.

Die intravaskulären hypertonischen und hypotonischen Injektionen der auf 30° C erwärmten Lösungen erfolgten durch den zentralen Stumpf derselben Vene, in die ich deshalb zwei Kanülen einlegte: eine gegen die Peripherie, die andere gegen das Herz hin. Zu diesem zweiten Zwecke wollte ich die andere V. jugularis nicht benutzen, um den Kreislauf des Blutes im Gehirn nicht zu sehr zu beeinträchtigen.

Der Urin wurde gesammelt vermittelst einer in die Kloake eingeführten und am Orificium anale befestigten Kanüle, da sich die von mir verwendeten Tiere wegen ihrer geringen Größe nicht für eine direkte Fistel der Harnleiter eigneten. Um reinen Urin

---

[1]) Die gewöhnlichste Nahrung der Granivoren enthält im Durchschnitt 5 bis 6 Prom. K und 0,1 bis 0,4 Prom. Na, während die der Carnivoren und speziell der Raubvögel eine gleiche Menge von Na- und K-Salzen enthält. (Bunge, Phys. d. Menschen 2, 112 [1904].)

zu erhalten, d. h. einen, der nicht mit Fäkalstoffen vermischt war, unterband ich das Darmrohr oberhalb der Mündung der Harnleiter (Ureteren), und die Kloake wurde sorgfältig gereinigt.

In jedem Falle wurde der größeren Sicherheit halber auf den ersten Teil des gesammelten Urins kein Gewicht gelegt.

Ich halte es nicht für überflüssig, Einzelheiten in bezug auf den Operationsakt anzuführen. Das Tier wird in geeigneter Weise auf dem Rücken befestigt, dann macht man einen Einschnitt in der Medianlinie vom unteren äußersten Ende des Sternum bis 2 cm oberhalb der Öffnung des Anus. Nachdem man in die Bauchmuskeln eingeschnitten und die dichte Schicht des darunter befindlichen Fettgewebes auseinandergezogen hat, durchtrennt man, stets mit Hilfe der Sonde, die Serosa. Hierauf faßt man mit vorsichtigem Griff, indem man sorgfältig vermeidet, die bei den Hühnern leicht zerreißlichen Gefäße der Eingeweide zu verletzen, mit dem Zeigefinger der rechten Hand den recto-cloacalen Trakt, hebt ihn zur Höhe der Wunde, bringt eine Ligatur entsprechend der Mündung der beiden Enden des Coecum an und bringt den Trakt wieder in die Tiefe der Bauchhöhle zurück. Hierauf folgt die Naht der Wunde. In den Fällen, in welchen die gleichzeitige Anlegung der Darmfistel erforderlich ist, führt man in das distale Ende des Dünndarms eine Glaskanüle ein, die man dann zwischen den Rändern der parietalen Wunde befestigt.

Die Blutproben (die ich durch Schütteln mit Glaskügelchen defibrinierte), sowie die Proben von Urin und Darmsaft wurden direkt in graduierten Glaszylindern aufgefangen, die mit eingeschliffenen Glasstöpseln verschlossen wurden.

Von allen so gesammelten Flüssigkeiten bestimmte ich die Gefrierpunkterniedrigung ($\varDelta$) mit dem Beckmannschen Apparate und das spezifische elektrische Leitvermögen (K) mit dem Kohlrauschschen Apparate. Bei einigen Flüssigkeiten bestimmte ich auch die Ausflußzeit (t) mit Hilfe des Ostwaldschen Viskosimeters.

Beim Urin habe ich den Gesamtstickstoff vermittelst der Kjeldahlschen Methode quantitativ bestimmt.

3. Beschreibung der Experimente.

Erste Reihe: Intravenöse Injektionen von hypotonischen Kochsalzlösungen.

Versuch I (5. März 1906): Erwachsener Hahn von 2,100 kg. — Indirekte Fistel der Ureteren und Darmfistel des Darmrohres.

3^h nachm. Dem peripheren Stumpfe der linken V. jugularis wird eine Blutprobe (I) entnommen, die in geschlossenem Gefäße durch Schütteln mit Glaskügelchen defibriniert wird.

3^h bis $3^h 30'$. Urinprobe I wird entnommen.

Tabelle I.

Blut	Δ des Blutes in toto	Elektrisches Leitvermögen des Blutserums	Urin	Volumen und Eigenschaften des Urins	Δ des Urins	Elektrisches Leitvermögen des Urins	Gesamt-stickstoff des Urins Prom.	Bemerkungen
I	0,615°	$K\ 35^0 = 154 \times 10^{-4}$	I	5 ccm, sauer, trüb, weißlich; beträchtl. Sediment	0,790°	$K\ 35{,}6^0 = 219 \times 10^{-4}$	7,20	Normaler in 35′ gesammelter Urin
			II	7 ccm, sauer, trüb, weißlich; wenig Sediment	0,335	112×10^{-4}	4,70	In 15′ nach Injektion von 25 ccm von 4 prom. NaCl-Lösung gesammelter Urin
			III	9 ccm, sauer, weniger trüb, gelbweißlich	0,295	98×10^{-4}	3,50	In 15′ gesammelter Urin
II	0,585	107×10^{-4}	IV	13 ccm, sauer, klar, gelb, (2. Tafel von Vogel)	0,290	107×10^{-4}	2,90	Blut, gesammelt nach der intravenösen Injektion von 50 ccm 4prom. NaCl-Lg. Urin, gesammelt nach der intravenösen Injektion von 50 ccm 4prom. NaCl-Lg.
III	0,575	106×10^{-4}	V	15 ccm, sauer, klar, hellgelb (1. Tafel von Vogel)	0,260	105×10^{-4}	1,20	Blut, gesammelt nach der Injektion von 100 ccm 4prom. NaCl-Lg. Urin, in 15′ gesammelt nach der Injektion von 100 ccm 4prom. NaCl-Lg.

3^h 30′. Es werden langsam in den zentralen Stumpf der V. jugularis sinistra 25 ccm einer 4 prom. NaCl-Lösung injiziert.

3^h 30′ bis 3^h 45′. Entnahme der Urinprobe II.

3^h 45′ bis 4^h. Entnahme der Urinprobe III.

4^h. Injektion von weiteren 25 ccm der 4 prom. NaCl-Lösung.

4^h 10′. Entnahme der Blutprobe II.

Tabelle II.

Blutproben	Δ des Blutes	Elektrisches Leitvermögen des Blutserums	Urinproben	Δ des Urins	Elektrisches Leitvermögen des Urins	Volumen und Eigenschaften des Urins	Gesamt-stickstoff des Urins Prom.	Bemerkungen
I	0,610°	K 35,8° = 155 × 10^{-4}	—	—	K 35,8° = 242 × 10^{-4}	—	—	Normales Blut
			I	0,820°	—	3 ccm, sauer, sehr trüb, weißlich, dichtes Sediment von Harnsäuresalzen	6,40	Normaler in 15′ gesammelter Urin
			II	0,530	170 × 10^{-4}	8 ccm, sauer, weniger trüb, gelblich (3. Tafel von Vogel).	4,50	In 15′ nach der intravenösen Injektion von 25 ccm 2 prom. Na Cl-Lösung gesammelter Urin
II	0,550	102 × 10^{-4}	—	—	—	—	—	Blut, gesammelt nach der intravenösen Injektion von 75 ccm 2 prom. Na Cl-Lösung
			III	0,280	118 × 10^{-4}	21 ccm, sauer, klar, hellgelb (2. Tafel von Vogel)	2	Urin, gesammelt in 15′ nach der intravenösen Injektion von 75 ccm 2 prom. Na Cl-Lösung
			IV	0,240	108 × 10^{-4}	16 ccm, sauer, klar, hellgelb (2. Tafel von Vogel)	1,80	Urin, gesammelt in 15′ nach der intravenösen Injektion von 75 ccm 2 prom. Na Cl-Lösung.

4h bis 4h 30′. Entnahme der Urinprobe IV.
4h 30′. Langsame Injektion von weiteren 50 ccm derselben Na Cl-Lösung.
4h 35′ bis 4h 50′. Entnahme der Urinprobe V.
5h. Tötung des Tieres durch Verblutenlassen.

Autopsie: Normale Organe; Darm leer, mit Ausnahme weniger mit Galle gefärbter Flüssigkeit, die sich in der Schlinge des Duodenums findet.

In Tabelle I sind die Resultate der physiko-chemischen Bestimmungen verzeichnet.

Versuch II (23. März 1906). Hahn von 2,400 kg Gewicht. Indirekte Fistel der Ureteren und Darmfistel.

1^h 30′ nachm. Aus dem peripheren Stumpf der V. jugularis sinistra wird Blutprobe I entnommen und in geschlossenem Gefäße vermittelst Glaskügelchen defibriniert.

1^h 30′ bis 1^h 45′. Entnahme der Urinprobe I.

1^h 45′. In den zentralen Stumpf der V. jugularis sinistra werden 25 ccm einer 2 prom. NaCl-Lösung injiziert.

2^h bis 2^h 15′. Entnahme der Urinprobe II.

2^h 20′. Langsame Injektion von weiteren 50 ccm derselben NaCl-Lösung.

2^h 30′ bis 2^h 45′. Entnahme der Blutprobe II, die wie I behandelt wird.

2^h 30′ bis 2^h 45′. Entnahme der Urinprobe III.

2^h 45′ bis 3^h. Entnahme der Urinprobe IV.

3^h. Beendigung des Experimentes und Tötung des Tieres.

Bei der Autopsie werden Organe normal gefunden. Darm leer.

Versuch III (26. März 1906). Kräftiger junger Hahn, 2 kg schwer.

Operation: Indirekte Fistel der Ureteren und Darmfistel.

2^h nachm. Die Blutprobe wird dem peripheren Stumpf der V. jugularis sinistra entnommen und wie die der vorigen Experimente defibriniert.

2^h 22′. Es werden langsam in den zentralen Stumpf der V. jugularis sinistra 25 ccm einer 2 prom. NaCl-Lösung injiziert.

2^h 30′ bis 2^h 35′. Entnahme der Urinprobe I.

2^h 50′. Injektion von weiteren 25 ccm derselben NaCl-Lösung.

2^h 50′ bis 3^h 5′. Entnahme der Urinprobe II.

3^h 7′. Entnahme der Blutprobe II.

3^h 10′. Injektion von weiteren 25 ccm derselben NaCl-Lösung.

3^h 10′ bis 3^h 25′. Entnahme der Urinprobe III.

3^h 30′. Langsame Injektion, unter Vermeidung des Eindringens von Luftblasen in den Kreislauf, von 10 ccm einer 10 prom. NaCl-Lösung. Kaum ist die Injektion beendet, so stirbt das Tier unter heftigen Krampfanfällen.

Bei der Autopsie Organe normal. Darm leer.

Zweite Reihe: Intravenöse Injektionen von hypertonischen NaCl-Lösungen.

Versuch IV (15. April 1906). Erwachsener Hahn von 2,200 kg Gewicht.

Operation: Indirekte Fistel der Ureteren und Darmfistel.

3^h nachm. Dem peripheren Stumpf der V. jugularis sinistra wird eine Blutprobe (I) entnommen, die in geschlossenem Gefäße mit Glaskügelchen defibriniert wird.

3^h 15′. Unter großen Vorsichtsmaßregeln und sehr langsam werden in die V. jugularis sinistra (zentraler Stumpf) 20 ccm 5 proz. Natriumchloridlösung injiziert. — Infolge dieser Injektion zeigt das Tier heftige Krampfanfälle. Aus der Fistel der Kloake kommen nur wenige Tropfen eines sehr dicken uratreichen Harns, die zu sammeln uns nicht gelingt.

Tabelle III.

Blutproben	Δ des Blutes	Elektrisches Leitvermögen des Blutserums	Urinproben	Volumen und Eigenschaften des Urins	Δ des Urins	Elektrisches Leitvermögen des Urins	Gesamtstickstoff des Urins Prom.	Bemerkungen
		K 35,9° = 157×10^{-4}				K 35,9°		Die Urinsekretion ist spärlich und es gelingt nicht, eine normale Urinprobe zu sammeln
I	0,620°	—	—	—	—	—	—	Normales Blut
			I	7 ccm, sauer, trüb, weißgelblich	0,640°	198×10^{-4}	6,30	Urin, gesammelt in 15′ nach Injektion von 25 ccm 2 prom. Na Cl-Lösung
			II	11 ccm, sauer, weniger trüb, gelblich (3. Tafel von Vogel)	0,290	106×10^{-4}	3,65	Urin, gesammelt in 15′ nach Injektion von 50 ccm 2 prom. Na Cl-Lösung
			III	21 ccm, sauer, klar, bernsteingelb (2. Tafel von Vogel)	0,240	98×10^{-4}	1,90	Urin, gesammelt in 15′ nach Injektion von 75 ccm 2 prom. Na Cl-Lösung

4h. Injektion von weiteren 10 ccm derselben Lösung.

4h 35′. Entnahme einer zweiten Blutprobe (II).

4h 50′. Intravenöse Injektion von weiteren 30 ccm einer (5 proz.) Na Cl-Lösung. Das Tier erträgt sie besser als die vorhergehenden.

4h 55′ bis 5h 5′. Entnahme der Urinprobe I.

5h 10′. Ich versuche eine dritte Injektion. Das Tier verfällt jedoch in heftige Zuckungen und verendet.

Autopsie: Organe normal; im Darm finden sich wenige Cubikcentimeter einer dicken mit Galle gefärbten Flüssigkeit.

Versuch V (16. April 1906). Erwachsener, sehr kräftiger Hahn von 2,400 kg Gewicht.

Operation wie bei den vorhergehenden Tieren: indirekte Fistel der Ureteren und Darmfistel.

2h 40′ nachm. Entnahme der Blutprobe I aus dem peripheren Stumpf der V. jugularis sinistra.

Tabelle IV.

Blutproben	Δ des Blutes	Elektrisches Leitvermögen des Blutes	Urinproben	Volumen und Eigenschaften des Urins	Δ des Urins	Elektrisches Leitvermögen des Urins	Gesamtstickstoff des Urins Prom.	Bemerkungen
I	0,620°	K 34,6° = 135×10^{-4}	—	—	—	—	—	Normal
II	0,680	174×10^{-4}	—	—	—	—	—	Blut, gesammelt nach intravenöser Injektion von 40 ccm einer 5 proz. NaCl-Lösung
			I	12 ccm, sauer, trüb, reich an Uraten	0,640°	142×10^{-4}	2,88	Urin, gesammelt nach Injektion von 70 ccm derselben NaCl-Lösung

3^h. Es werden vorsichtig in mehreren Abständen in den zentralen Stumpf derselben Vene 10 ccm einer 10 proz. NaCl-Lösung injiziert.

3^h bis 3^h 20′. Entnahme einer Urinprobe (I).

3^h 25′. Injektion von weiteren 6 ccm derselben NaCl-Lösung.

3^h 20′ bis 3^h 30′. Entnahme der Urinprobe II.

3^h 30′. Entnahme der Blutprobe II.

3^h 35′. Injektion von weiteren 5 ccm derselben NaCl-Lösung.

3^h 35′ bis 3^h 45′. Entnahme der Urinprobe III.

3^h 45′ bis 4^h. Es werden in zwei Absätzen 50 ccm einer 10 proz. NaCl-Lösung injiziert. Das Tier verträgt die Injektion gut; man bemerkt sogleich, daß die in den Dünndarm eingeführte Kanüle sich mit gelber, breiiger Flüssigkeit füllt, und es gelingt, eine Probe von etwa 4 ccm (I) dieser Flüssigkeit zu sammeln.

3^h 55′. Entnahme der Blutprobe III.

3^h 55′ bis 4^h 30′. Entnahme der Urinprobe IV.

4^h 40′. Das Tier wird getötet.

Autopsie: Normale Organe. Dünn- und Dickdarm voll gelblicher, fadenziehender Flüssigkeit (etwa 25 ccm, II).

Versuch VI (22. April 1906). Junger, kräftiger Hahn von 2,500 kg Gewicht.

Operation: Dünndarmfistel und indirekte Fistel der Ureteren.

1^h 10′ nachm. Dem peripheren Stumpf der V. jugularis sinistra wird eine Blutprobe (I) entnommen und vermittelst Glaskügelchen defibriniert.

1^h 12′ bis 1^h 27′. Entnahme der Urinprobe I.

1^h 30′. Es werden in den zentralen Stumpf der V. jugularis sinistra 25 ccm einer 10 proz. NaCl-Lösung injiziert.

Tabelle V.

Blutproben	Δ des Blutes	Elektrisches Leitvermögen des Blutserums	Urinproben	Volumen und Eigenschaften des Urins	Δ des Urins	Elektrisches Leitvermögen des Urins	Gesamtstickstoff des Urins Prom.	Darmsaftproben	Δ des Darmsaftes	Elektrisches Leitvermögen des Darmsaftes	Bemerkungen
		K 34,6° =				K 34,6° =				K 34,6° =	
I	0,615°	135×10^{-4}	—	—	—	—	—	—	—	—	Normales Blut
			I	8 ccm, sauer, mit harnsauren Salzen beladen	0,600°	177×10^{-4}	1,18	—	—	—	Urin, gesammelt in 5′ unmittelbar nach der Injektion von 10 ccm einer 10 proz. Na Cl-Lösung
			II	10 ccm, sauer, wenig harnsaure Salze, fast klar	0,565	127×10^{-4}	1,08	—	—	—	Urin, gesammelt in 10′ nach der Injektion von 15 ccm einer 10 proz. Na Cl-Lösung
II	0,725	166×10^{-4}	—	—	—	—	—	—	—	—	Blut, gesammelt nach der Injektion von 16 ccm einer 10 proz. Na Cl-Lösung
			III	11 ccm, sauer, wenig harnsaure Salze, fast klar	0,645	142×10^{-4}	0,90	—	—	—	Urin, gesammelt in 10′ nach der Injektion von 21 ccm einer 10 proz. Na Cl-Lösung
III	1,065	237×10^{-4}	—	—	—	—	—	—	—	—	Blut, gesammelt nach der Injektion von 21 ccm einer 10 proz. Na Cl-Lösung
			IV	5 ccm, bluthaltig	0,940	214×10^{-4}	0,79	I	0,980°	—	Urin, gesammelt in 35′ nach Gesamtinjektion von 71 ccm der 10 proz. Na Cl-Lösung
								II	0,990	227×10^{-4}	Darmsaft, gesammelt nach dem Tode des Tieres

Tabelle VI.

Blutproben	Δ des Blutes	Elektrisches Leitvermögen des Blutserums	Urinproben	Volumen und Eigenschaften des Urins	Δ des Urins	Elektrisches Leitvermögen des Urins	Gesamt-stickstoff des Urins Prom.	Darmsaftproben	Δ des Darmsaftes	Elektrisches Leitvermögen des Darmsaftes	Bemerkungen
		K 34,6° =				K 34,6° =				K 34,6° =	
I	0,620°	140×10^{-4}	—	—	—	—	—	—	—	—	Normales Blut
			I	4 ccm, sauer, weißlich, harnsäurereich	0,715°	260×10^{-4}	5,80	—	—	—	Normaler Urin, gesammelt in 15′
			II	7 ccm, sauer, weniger dick	0,640	190×10^{-4}	3,40	—	—	—	Urin, gesammelt in 15′ nach der Injektion von 25 ccm der 10proz. NaCl-Lösung
II	1,090	248×10^{-4}	—	—	—	—	—	—	—	—	Blut, gesammelt nach der Injektion von 75 ccm der 10proz. NaCl-Lösung
			III	14 ccm, sauer, klar, hellgelb	0,950	220×10^{-4}	0,95	—	—	—	Urin, gesammelt in 15′ nach der Injektion von 75 ccm der 10proz. NaCl-Lösung
								I	0,890°	210×10^{-4}	Darmsaft, gesammelt vermittelst Ausdrückens des Dünndarms

1^h 30′ bis 1^h 45′. Entnahme der Urinprobe II.

1^h 50′. Es werden langsam weitere 50 ccm einer 10 proz. NaCl-Lösung injiziert.

1^h 55′. Die Blutprobe II wird entnommen und wie Blutprobe I defibriniert.

1^h 55′ bis 2^h 10′. Entnahme der Urinprobe III.

2^h 5′. Die Kanüle der Darmfistel füllt sich mit dicker, gelblicher Flüssigkeit, aber trotz sanfter Massage des Abdomens gelingt es, nur wenige Tropfen zu sammeln.

2^h 10′. Während ich eine weitere Injektion von 10 proz. NaCl versuche, wird das Tier von heftigen Zuckungen ergriffen und verendet.

Autopsie: Normale Organe. Leichtes Blutextravasat im Peritoneum; Darm voll gelblicher, dicker Flüssigkeit (etwa 20 ccm, I).

Dritte Reihe: Fleischfressende Vögel. — Intravenöse Injektionen hypertonischer und hypotonischer NaCl-Lösungen.

Versuch VII (24. April 1906). Erwachsener Kiebitz. — Gewicht 320 g (kräftiges Tier, seit wenigen Tagen gefangen).

Wegen der geringen Größe des Tieres verzichten wir auf die Präparierung der V. jugularis und beschränken uns auf die indirekte Fistel der Ureteren.

Es gelingt uns nicht, eine Probe von normalem Urin zu erhalten. Mit höchster Vorsicht machen wir eine Injektion von 20 ccm einer 2 proz. NaCl-Lösung in die Peritonealhöhle. Nach kurzer Zeit füllt sich die in die Kloake eingeführte Kanüle mit Urin und wir sammeln daraus eine Probe I von 8 ccm, die alle Merkmale des Hühnerurins besitzt ($\Delta = 0{,}430^0$); eine Probe II von 9 ccm zeigt ein $\Delta = 0{,}245^0$.

Bei der Sektion erweist sich der Darm leer.

Versuch VIII (25. April 1906). Kräftiger Kiebitz von 430 g Gewicht, ein Tier, das vor wenigen Tagen gefangen war und wie das vorige mit Seidenwürmern ernährt wurde.

Operation: Indirekte Fistel der Ureteren. Es werden 20 ccm einer 10 proz. NaCl-Lösung in die Peritonealhöhle injiziert.

Ungefähr 10′ nach der Injektion verendete das Tier unter Zuckungen. — Aus der Kloake erhält man wenige Cubikcentimeter eines an Harnsäure reichen Urins ($\Delta = 0{,}520^0$).

Sektion: Der Dünndarm voll von gelblicher, fadenziehender Flüssigkeit (filtriert: $\Delta = 0{,}660^0$).

4. Allgemeine Betrachtungen und Schlußfolgerungen.

Wie man aus den angeführten Experimenten (deren wichtigste Daten ich der größeren Deutlichkeit halber in der beigefügten Tabelle VII zusammengestellt habe) entnehmen kann, schwankt die Erniedrigung des Gefrierpunktes des Hühnerblutes zwischen $\Delta = 0{,}610^0$ und $\Delta = 0{,}620^0$.

Tabelle VII.

Molekulare Konzentration und elektrisches Leitvermögen des Blutes und des Urins der Hühner unter normalen Bedingungen und nach Injektion von hypotonischen und hypertonischen NaCl-Lösungen.

Fortlaufende Nr. der Experimente		Δ des Blutes	Δ des Urins	Elektrisches Leitvermögen des Blutserums in MHO	Elektrisches Leitvermögen des Urins in MHO	Experimentelle Bedingungen
				K 35,6° =	K 35,6° =	
I.	1	0,615°	0,790°	154×10^{-4}	219×10^{-4}	Blut und Urin normal
	2	0,585	0,290	107×10^{-4}	107×10^{-4}	Blut und Urin nach intravenöser Injektion von 50 ccm 4 prom. NaCl-Lg.
	3	0,575	0,260	106×10^{-4}	105×10^{-4}	Blut und Urin nach intravenöser Injektion von 100 ccm 4 prom. NaCl-Lg.
				K 35,8° =	K 35,8° =	
II.	1	0,610	0,820	155×10^{-4}	242×10^{-4}	Blut und Urin normal
	2	0,550	0,820	102×10^{-4}	118×10^{-4}	Blut und Urin nach intravenöser Injektion von 75 ccm 2 prom. NaCl-Lg.
				K 35,9° =		
III.	1	0,620	—	157×10^{-4}	106×10^{-4}	Normales Blut.
	2	—	0,290	—	98×10^{-4}	Urin, gesammelt nach intravenöser Injektion von 50 ccm 2 prom. NaCl-Lg.
	3	—	0,240	—	—	—
				K 34,6° =	K 34,6° =	
IV.	1	0,620	—	135×10^{-4}	—	Normales Blut
	2	0,680	—	174×10^{-4}	—	Blut nach intravenöser Injektion von 40 ccm 5 proz. NaCl-Lg.
	3	—	0,640	—	142×10^{-4}	Urin, gesammelt nach intravenöser Injektion von 70 ccm 5 proz. NaCl-Lg.
V.	1	0,615	—	135×10^{-4}	—	Normales Blut
	2	0,725	—	166×10^{-4}	—	Blut nach intravenöser Injektion von 16 ccm 10 proz. NaCl-Lg.
	3	1,065	0,645	237×10^{-4}	142×10^{-4}	Blut und Urin nach intravenöser Injektion von 21 ccm 10 proz. NaCl-Lg.
VI.	1	0,620	0,715	140×10^{-4}	260×10^{-4}	Blut und Urin normal
	2	1,090	0,950	248×10^{-4}	220×10^{-4}	Blut und Urin nach intravenöser Injektion von 75 ccm 10 proz. NaCl-Lg.

Wenn man bedenkt, daß die genannten Werte sich auf Blut beziehen, das in offenen Gefäßen geschüttelt wurde und mithin in beträchtlichem Maße Sauerstoff aufnahm, so erscheinen sie viel höher als die des Blutes der Säugetiere, wenn es unter denselben Bedingungen untersucht wird.

Das bei einer Temperatur von etwa 35° C bestimmte elektrische Leitvermögen des Blutserums der Hühner schwankt zwischen $K = 135 \times 10^{-4}$ und $K = 157 \times 10^{-4}$ und ist demzufolge auch höher als das der Säugetiere. Diese Daten sprechen einerseits dafür, daß die hohe molekulare Konzentration des Blutes, wenigstens zum Teil, von einem größeren Gehalte an Elektrolyten herrührt, sie zeigen andererseits, daß bei den Hühnern der osmotische Druck der inneren Flüssigkeiten sowie die Temperatur um einen höheren Stand herum schwankt als bei den Säugetieren. Vielleicht steht dies zum Teil in Beziehung zu der speziellen Natur des Stoffwechsels der Vögel, zum Teil zu ihrer Nahrung, die im allgemeinen wasserärmer ist.

Nicht immer ist es mir gelungen, von den Hühnern normale Urinproben zu erhalten. Bei den Experimenten, bei welchen mir dies möglich war (I, II und VI), beweisen die Werte, die ich für Δ erhielt, augenscheinlich, daß die osmotische Konzentration des Hühnerurins kaum ein wenig höher ist als die des Blutes. Das elektrische Leitvermögen dagegen ist relativ hoch ($K = 219 \times 10^{-4}$ bis 260×10^{-4}); dies beweist, daß, wenn auch die Menge der Elektrolyten bedeutend ist, der osmotische Druck im Verhältnis zu dem des Urins der Säugetiere niedrig bleibt, ohne Zweifel weil im Urin der Vögel wie in dem der Schildkröten der größte Teil der stickstoffhaltigen Körper in ungelöster Form austritt und somit keinen Einfluß auf die osmotische Konzentration ausüben kann.

Die intravaskulären Injektionen von hypotonischen (2 bis 4 prom.) NaCl-Lösungen wurden im allgemeinen von den Hühnern gut vertragen und riefen eine beträchtliche Verminderung des osmotischen Druckes des Blutes hervor, der je nach der Menge der injizierten Flüssigkeit 0,060 bis 0,040° C betrug. Gleichzeitig trat eine Verminderung der elektrischen Leitfähigkeit des Serums ein, die von $K = 150 \times 10^{-4}$ nach Injektion von 100 ccm einer 4 prom. NaCl-Lösung auf $K = 105 \times 10^{-4}$ sank.

Diese Resultate unterscheiden sich etwas von denen, die man bei Säugetieren erhält, z. B. bei Hunden, bei denen es sehr schwer hält zu bewirken, daß vermittelst hypotonischer Lösungen der osmotische Druck des Blutes sinkt; dies

kann aber ausschließlich von dem Verhältnis zwischen der Menge der injizierten Flüssigkeit und der Gesamtmenge der Körperflüssigkeiten bei den Hühnern einerseits, bei den Hunden andererseits abhängen.

Die intravaskulären Injektionen von hypertonischen (5 bis 10-prozentigen) NaCl-Lösungen werden im allgemeinen schlecht vertragen, sowohl von Säugetieren, z. B. von Hunden (Bottazzi und Onorato[1]), als auch, und zwar noch viel weniger, von Hühnern. Die Injektionen erregen bei ihnen häufig heftige Konvulsionen und führen sogar, namentlich wenn die Injektionen nicht sehr langsam vorgenommen werden, den Tod des Tieres herbei. In der Tat mußte ich, um die in dieser Arbeit angeführten wenigen Fälle des Überlebens zu erhalten, eine sehr große Zahl von Versuchen anstellen, da die meisten durch das Verenden der Tiere unterbrochen wurden. In den wenigen Fällen, in denen die hypertonischen Lösungen ertragen wurden, erregten sie Erhöhung der Molekularkonzentration, wie man wohl begreift, sowie des elektrischen Leitvermögens des Blutes.

Der geringe Widerstand der Hühner gegen hypertonische NaCl-Lösungen kann vielleicht durch die Annahme erklärt werden, daß einerseits bei den Vögeln die Mechanismen der Regulierung des osmotischen Druckes (nach schroffen Steigerungen des letzteren) nicht so gut entwickelt sind wie bei den Säugetieren; andererseits, daß das Kochsalz für diese Tiere relativ giftiger ist und endlich, daß die injizierte Menge Salz im Verhältnis zum Körpergewicht größer war, als diejenige, welche bei den Experimenten von Galeotti[2]), Bottazzi u. a. bei Hunden injiziert wurde.

Die Schnelligkeit der Sekretion des Urins nimmt zu (wie man aus Tabelle VIII ersehen kann) sowohl nach intravaskulären Injektionen von hypotonischen als auch von hypertonischen Lösungen. Im ersteren Falle sinkt der osmotische Druck des Urins plötzlich und wird beträchtlich geringer als der des Blutes, während das elektrische Leitvermögen ebenfalls, aber parallel dem des Blutes, abnimmt. Im zweiten Falle erhält man in einem ersten Zeitabschnitt Verminderung des osmotischen Druckes und des elektrischen Leitvermögens des Urins (wie bei den Hunden, Kaninchen usw.) und dann Zunahme von beiden; die Zunahme ist jedoch geringer

---

[1]) Fil. Bottazzi und R. Onorato, Beitr. zur Physiologie der Niere 2. Arch. f. An. u. Physiol., physiol. Abteil., Jahrg. 1906, S. 205.

[2]) Galeotti, Über die Arbeit, welche die Nieren leisten usw. Arch. f. Anat. u. Physiol., physiol. Abteil., Jahrg. 1902, S. 209.

Tabelle VIII.

Beziehung zwischen Schnelligkeit der Sekretion, Molekularkonzentration und elektrischem Leitvermögen des Hühnerurins unter normalen Bedingungen und nach hypotonischen und hypertonischen Injektionen von NaCl.

Experimentelle Bedingungen	Schnelligkeit der Sekretion in ccm per Min.	Molekularkonzentration (Δ)	Elektrisches Leitvermögen
I. Experiment:			
Normal	0,33	0,790°	$K\,35{,}6^0 = 219 \times 10^{-4}$
Nach Injektion von 25 ccm einer 4prom. NaCl-Lösung	0,46	0,335	„ 112×10^{-4}
15′ danach	0,60	0,295	„ 98×10^{-4}
Nach Injektion von weiteren 50 ccm derselben Lösung . .	0,43	0,290	„ 107×10^{-4}
30′ danach	0,00	0,260	„ 105×10^{-4}
II. Experiment:			
Normal	0,20	0,820	$K\,35{,}8^0 = 242 \times 10^{-4}$
Nach Injektion von 25 ccm einer 2proz. NaCl-Lösung	0,43	0,530	„ 170×10^{-4}
Nach weiterer Injektion von 50 ccm derselben Lösung . .	1,40	0,280	„ 118×10^{-4}
15′ danach	1,36	0,240	„ 108×10^{-4}
III. Experiment:			
Nach Injektion von 25 ccm einer 2prom. NaCl-Lösung	0,46	0,640	$K\,35{,}9^0 = 198 \times 10^{-4}$
Nach Injektion von weiteren 25 ccm derselben Lösung . .	0,73	0,290	„ 106×10^{-4}
Nach weiteren 25 ccm	1,40	0,240	„ 98×10^{-4}
IV. Experiment:			
Nach Injektion von 70 ccm einer 5proz. NaCl-Lösung	1,20	0,640	$K\,34{,}6^0 = 142 \times 10^{-4}$
V. Experiment:			
Nach Injektion von 10 ccm einer 10proz. NaCl-Lösung	1,60	0,600	„ 177×10^{-4}
Nach Injektion von weiteren 5 ccm derselben Lösung . .	1,00	0,565	„ 127×10^{-4}
Nach Injektion von weiteren 5 ccm derselben Lösung . .	1,10	0,645	„ 142×10^{-4}
Nach Injektion von weiteren 50 ccm derselben Lösung . .	0,15	0,940	„ 214×10^{-4}
VI. Experiment:			
Normal	0,26	0,715	„ 260×10^{-4}
Nach Injektion von 25 ccm einer 10proz. NaCl-Lösung	0,50	0,640	„ 190×10^{-4}
Nach Injektion von weiteren 50 ccm derselben Lösung . .	0,90	0,950	„ 220×10^{-4}

als die, welche man im Blute beobachtet, derart, daß man nach Injektionen von hypertonischen Lösungen stets hypotonischen Urin erhält. Kurz, die Niere der Vögel reagiert gegen hypertonische Lösungen wie die der Säugetiere; zuerst versucht sie, die Salze auszuscheiden, indem sie die geringste osmotische Arbeit verrichtet (weniger konzentrierter Harn), dann, indem sie relativ viel Salz ausscheidet (konzentrierter Harn).

Mit der Zunahme der Salzausscheidung hält die Zunahme der Stickstoffausscheidung nicht gleichen Schritt, wie dies schon bei den Säugetieren beobachtet wurde (Bottazzi und Onorato[1]), und der Gesamtstickstoff nimmt ab, auch bei den Hühnern, sowohl nach hypotonischen als auch nach hypertonischen Injektionen, in dem Maße wie die Geschwindigkeit der Sekretion des Urins wächst.

Intravaskuläre Injektionen von hypertonischen Kochsalzlösungen rufen bei Hühnern Sekretion des Darms hervor.

Die geringe Widerstandsfähigkeit der Hühner gegen endovaskuläre Injektionen von hypertonischen Lösungen hat mir nicht gestattet, bei ihnen den Verlauf der Urinsekretion unter diesen Bedingungen ausreichend zu bestimmen. Allerdings nimmt die Schnelligkeit der Sekretion des Urins zu, aber nur dann, wenn es möglich war, eine bedeutende Quantität von hypertonischer Lösung zu injizieren. Es scheint also, daß bei diesen Tieren die Ausscheidung durch die Nieren nicht prompt genug eintritt, um die durch die hypertonischen Lösungen hervorgerufene Störung wieder auszugleichen und daß sie, was die Regulierung des Druckes der inneren Flüssigkeiten betrifft, nicht so wirksam ist, wie bei den Säugetieren und wie bei den Vögeln selbst, wenn eine Störung im entgegengesetzten Sinne, d. h. eine plötzliche Verminderung des osmotischen Druckes des Blutes, gegeben ist.

Eine Bestätigung des Gesagten liegt in der bei den Hühnern relativ raschen Intervention des Darmrohres, dessen vikariierende Funktion sich augenfällig aus Versuch V (Injektion von hypertonischer Lösung) ergibt. Hier trat nämlich der Stillstand der Nierensekretion gleichzeitig ein mit dem Erscheinen eines reichlichen Ausflusses von Darmflüssigkeit, deren physiko-chemische Eigenschaften sich von jenen des unter denselben Bedingungen ausgeschiedenen Harns nicht unterschieden.

Bekanntlich beobachtet man nicht selten bei den Säugetieren nach Injektion von hypertonischen Lösungen reichliche Diurese,

---

[1]) A. a. O.

ohne daß aus der Darmfistel Sekret austritt. Letzteres beginnt im allgemeinen später zu fließen, was vermuten läßt, daß bei den Hunden eine bestimmte Molekularkonzentration des Blutes zwar zur Erregung der Nierenfunktion befähigt ist, nicht aber in gleichem Maße für die Erregung der sekretorischen Funktion des Darms oder aber, daß die Darmsekretion erst beginnt, wenn das Nierenepithel in seiner Leistungsfähigkeit erschöpft oder auf irgend eine Weise durch das injizierte Salz verändert ist.

Wie dem auch sei, so scheint nicht zweifelhaft, daß die Nieren der Hühner, wenn man in ihre Gefäße hypertonische Lösungen injiziert, schneller müde werden oder aus einem anderen Grunde bei der Regulierung des osmotischen Druckes anderen Ausscheidungsvorgängen den Platz räumen. Und demnach kann man von diesem Gesichtspunkte aus nicht sagen, es existiere eine vollkommene Analogie der Funktion zwischen der Niere der Säugetiere und der Vögel.

Es wäre von Interesse, festzustellen, ob die Intoleranz dieser Tiere hypertonischen Lösungen gegenüber von dem absoluten Werte der Molekularkonzentration abhängt, die das Blut nach solchen Injektionen erreicht, oder von der Natur des injizierten Salzes, d. h. seiner Kationen. Von gleicher Bedeutung wäre es, zu sehen, ob bei den Vögeln andere Regulierungsmechanismen für den osmotischen Druck existieren analog denjenigen, welche vor kurzem bei den Säugetieren nachgewiesen worden sind (A. Jappelli[1]).

So viel ist gewiß, daß die Vögel und speziell die Hühner, während sie sich auch gegen eingreifende Versuche, den osmotischen Druck des Blutes zu vermindern, mit Erfolg zu wahren vermögen, auf der anderen Seite durch die plötzliche Ausscheidung sehr verdünnten Urins beweisen, daß sie viel weniger als die Säugetiere mit Schutzeinrichtungen gegen starke Erhöhungen der Molekularkonzentration ihrer zirkulierenden Flüssigkeiten ausgestattet sind.

---

[1]) A. Jappelli, Rôle du tissu musculaire dans la régulation de la pression osmotique du sang. Arch. internat. de Physiol. 1906, IV, 369.

XXX.

Über das biologische Verhalten von Phenylalkylaminen und Phenylalkylammoniumbasen.

Von Dr. med. **Herm. Hildebrandt,**
Privatdozenten an der Universität Halle a. S.

Aus dem pharmakologischen Institut zu Halle a. S.

---

1. Phenylalkylamine.

In einer früheren Untersuchung [1]) wurde gezeigt, daß nach Darreichung von Dimethyl-p-toluidin beim Kaninchen Dimethyl-p-amidobenzoësäure im Harn auftritt, gebunden an Glykuronsäure; die Darstellung der gepaarten Verbindung ist jedoch auf diese Weise schwierig, und es wurde bereits betont, daß man sie am bequemsten erhält, wenn man den Tieren die leicht zugängliche p-Dimethyl-amidobenzoësäure eingibt.

Das Molekül des Dimethyl-p-toluidins erfährt im Organismus teilweise noch eine weitere Oxydation, indem in ortho-Stellung zur Amidogruppe eine Hydroxylierung erfolgt. Ich konnte diesen Vorgang in folgender Weise nachweisen: Der Harn wurde mit starker Schwefelsäure am Rückflußkühler einige Stunden gekocht, filtriert, alkalisch gemacht und destilliert; es ging Dimethyl-o-amidophenol [2]) über, welches an der rotvioletten Färbung mit Eisenchlorid erkannt werden konnte. Infolge des Kochens mit Mineralsäure war die aus dem Methyl entstandene Karboxylgruppe abgespalten worden. Wurde das vorherige Kochen mit Schwefelsäure unterlassen, so ging beim Destillieren der alkalisch gemachten Flüssigkeit kein Dimethyl-o-amidophenol über.

Dimethyl-o-toluidin erfährt im Organismus des Kaninchens ebenfalls eine Oxydation der CH_3-Gruppe zu COOH; doch gelang es mir nicht, aus dem Harn die entsprechende Dimethyl-o-amido-

---

[1]) Diese Beiträge **7**, 433 (1905).
[2]) Peter Griess, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **13**, 249 (1880).

benzoesäure darzustellen. Nach Willstaedter und Kahn[1] erhält man diese leicht durch Methylierung von o-Amidobenzoësäure (Anthranilsäure); sie entsteht als Endprodukt der Methylierung, ohne daß es zu einer Trimethylbetaïnverbindung kommt, wie Ch. Laut angenommen hatte. Nach dem Abdestillieren des Holzgeistes neutralisiert man den Rückstand mit verdünnter Jodwasserstoffsäure und fällt mit Jodjodwasserstoff; das Perjodid gibt bei der Bearbeitung mit Wasserdampf sein locker gebundenes Jod ab. Das so erhaltene Salz schmilzt bei 175°; durch Behandlung mit Silberoxyd gewinnt man daraus die freie Dimethylanthranilsäure (Schmelzpunkt 70°).

Dimethylanthranilsäure zeigt eine erheblich größere Toxizität als die bereits früher von mir untersuchte[2] p-Verbindung. Ein Kaninchen von 1800 g ging nach interner Darreichung von 2 g des Jodhydrates unter heftigen Krämpfen zugrunde; die Krämpfe traten erst etwa 30 Minuten nach der Eingabe auf. Im Harn der Tiere erschien eine mit Glykuronsäure gepaarte Verbindung, welche ebenso wie die Dimethylanthranilsäure zum Unterschiede von der p-Verbindung so leicht löslich war, daß ihre Darstellung nicht gelang. Die durch Behandeln des Bleisalzes mit Schwefelwasserstoff erhaltene Lösung wurde vorsichtig eingeengt und mit Kaliumhydrat neutralisiert; es schied sich ein Salz ab, das jedoch nicht analysenrein war. Der Versuch, die freie gepaarte Verbindung aus diesem Salze zu gewinnen, mißlang ebenfalls. Dagegen habe ich durch Kochen der nach dem Entbleien mit Schwefelwasserstoff erhaltenen Lösung der gepaarten Säure am Rückflußkühler eine Spaltung herbeigeführt und über das Perjodid wieder die Dimethylanthranilsäure als Jodhydrat gewonnen. Eine Oxydation am Benzolring findet nicht statt; eine solche hätte nur in p-Stellung zur Amidogruppe erfolgen können; nach dem Kochen mit Mineralsäure war kein Dimethyl-p-amidophenol nachweisbar.

Hingegen war Dimethyl-p-amidophenol nachweisbar, wenn der nach Darreichung von Dimethyl-o-toluidin aus dem Harn erhaltene zweite Bleiniederschlag mit Schwefelsäure zerlegt und anhaltend gekocht wurde. Es geht hieraus hervor, daß auch Dimethyl-o-toluidin im Organismus eine Oxydation der CH_3-Gruppe am Benzolring zu COOH erfährt, wobei aber gleichzeitig und anscheinend überwiegend eine Oxydation am Benzolring durch Hydroxylierung in p-Stellung zur Amidogruppe erfolgt.

[1] Ber. d. deutsch. chem. Ges. 37, 406 (1904).

[2] l. c.

Bei den Versuchen mit Dimethyl-o-toluidin konnten wegen der starken Giftigkeit nur kleine Dosen verabreicht werden; ich gab jeden zweiten Tag 0,5 ccm, gemischt mit der doppelten Menge Olivenöl mittels Schlundsonde. Der Harn wurde auch bei Rübenfütterung nur spärlich gelassen, hatte eine tiefrote Farbe und zeigte deutlich das Spektrum und die Eigenschaften des Oxyhämoglobins. Blutkörperchen wurden im Harn nicht gefunden; es handelt sich also nicht um eine Nierenblutung, sondern um eine Ausscheidung von gelöstem Blutfarbstoff. Eine solche Eigenschaft ist bisher nur bei wenigen Giften, wie Arsenwasserstoff, Phallin, Helvellasäure beobachtet worden. In den inneren Organen war Methämoglobin nachweisbar.

Ein Hund von 8 kg erhielt subkutan 3 ccm mit Öl *āā*. Tags darauf komatöser Zustand, noch zwei weitere Tage anhaltend. Ein der Ohrvene entnommener Blutstropfen zeigte sepiafarbene Beschaffenheit und enthielt reichlich Methämoglobin. Beim Behandeln mit Bleiacetat war das Filtrat rötlich gefärbt und enthielt Hämoglobin; der Harn selbst war dunkelgelbbraun. Der basische Bleiniederschlag enthielt eine direkt Fehlingsche Lösung reduzierende Substanz, offenbar gleichfalls eine Glykuronsäureverbindung. Es erfolgte Erholung.

Die starke Blutwirkung ist zweifellos bedingt durch die in o-Stellung zur Amidogruppe befindliche Methylgruppe, da bei der p-Verbindung etwas analoges nicht zur Beobachtung kam. Auch dem Dimethylanilin kommt eine derartige Wirkung nicht zu.

Ein Hund zeigte nach subkutaner Injektion von 3 ccm mit ol. oliv. *āā* keine Wirkung; der Harn enthielt keinen Blutfarbstoff, im zweiten Bleiniederschlage fand sich eine direkt Fehlingsche Lösung reduzierende Verbindung.

Dimethylanilin wurde schon von Harnack[1]) gelegentlich seiner Untersuchungen über Ditaïn in seinen physiologischen Wirkungen besprochen und als Nerven- und Muskelgift erkannt. Ich füge dem hinzu, daß es beim Kaninchen nach innerlicher Darreichung zu reichlicher Ausscheidung von Eiweiß führt. Der Harn gab direkt die Indophenolreaktion. Wenn man den Harn unter Zusatz von Schwefelsäure kurze Zeit erwärmte, so erreichte man damit außer einer Abscheidung der reichlichen Eiweißmengen auch eine Spaltung der im Harn enthaltenen gepaarten Verbindungen. Setzte man zu der nach dem Abkühlen filtrierten schwefelsauren Flüssigkeit Jodwasserstoffsäure, so entstand eine reichliche Ausscheidung, welche abfiltriert wurde. Machte man nun alkalisch

---

[1]) Arch. f. experim. Path. u. Pharm. 7, 143 (1877).

und destillierte, so ging, wenn auch nur in geringen Mengen, eine ölige Substanz über; sie gab nicht die Reaktion des Dimethylanilins (Bildung von Malachitgrün mit Benzotrichlorid und Chlorzink), dagegen färbte sie sich mit Eisenchlorid violettrot, also wie Dimethyl-o-amidophenol. Ferner konnte aus dem alkalischen Destillationsrückstande in reichlicher Menge Dimethyl-p-amidophenol erhalten werden. Wenn der nach Darreichung von Dimethylanilin gelassene Harn nach dem Bleiverfahren verarbeitet wurde, gelang es nach dem Zersetzen des zweiten Bleiniederschlages mittels Schwefelsäure nur Dimethyl-p-amidophenol nachzuweisen.

Nach den bisher vorliegenden Beobachtungen führt der Organismus Oxydationen am Benzolkern stets in p-Stellung zu einer bereits am Kerne vorhandenen Gruppe aus; daher auch hier das Auftreten von Dimethyl-p-amidophenol, ganz wie nach Acetanilid Acet-p-amidophenol. Eine Oxydation von Dimethylanilin in der o-Stellung könnte eventuell bedingt sein durch eine primäre Oxydation am Stickstoff und nachträgliche Verschiebung des Sauerstoffs; ein solcher Vorgang ist nämlich von Bamberger und Tschirner[1]) beim Dimethylanilinoxyd beobachtet worden. Es war also zu untersuchen, ob etwa aus Dimethylanilin im Organismus das Oxyd von Bamberger und Tschirner entstände und ferner das Verhalten dieses Oxyds im Organismus selbst zu berücksichtigen.

$C_6H_5.N = (CH_3)_2$ (N··O)	$C_6H_5.N = (CH_3)_2$ (HO / OH)	$C_6H_5.N = (CH_3)_2$ (HO / Cl)
Dimethylanilinoxyd	sein Hydrat	sein Chlorhydrat (Dimethylphenyloxyammoniumchlorhydrat).

Die genannten Autoren erhielten das Oxyd aus Dimethylanilin durch Oxydation mittels H_2O_2; später fanden Bamberger und Rudolf[2]), daß auch Sulfomonopersäure (Caros Reagens) das Dimethylanilin oxydiert und zwar erheblich rascher. Durch Zink und Salzsäure und durch Schwefelammon wird das Oxyd wieder zu Dimethylanilin reduziert. Ferner fanden Bamberger und Leyden[3]), daß das fünfwertige N-Atom sich leicht des mit ihm verbundenen Sauerstoffatoms entledigt, um in den stabilaren Zustand der Trivalenz zurückzukehren; schon beim längeren Erwärmen

[1]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 32, 342 (1899).
[2]) Ebenda 35, 1082 (1902).
[3]) Ebenda 34, 12 (1901).

des Chlorhydrates auf dem Wasserbade bildet sich Dimethylanilin neben anderen Zersetzungsprodukten.

Hiernach konnte es in der Tat Schwierigkeiten haben, nachzuweisen, ob das Oxyd im Organismus aus Dimethylanilin entstehe. Bei gewöhnlicher Temperatur ist freilich die Sauerstoffabgabe seitens des Dimethylanilinoxyds keine so besonders leichte; eine Lösung des Chlorhydrates bläut Jodkaliumstärkekleister erst auf Zusatz von Ferrosulfat.

Schon der Versuch am Frosche zeigte, daß das Oxyd wesentlich weniger different ist als das Dimethylanilin.

Injektion von 1 ccm einer Lösung von 1,73 Oxydimethylanilin-HCl : 100 war bei einer großen Esculenta ohne jede Wirkung; die gleiche Menge der entsprechenden Lösung von 1,2 Dimethylanilin : 100 bewirkte bereits völlige Lähmung am Kontrolltier.

Vom Kaninchen wurde die einmalige Dosis von 4 g des Oxyds als Lösung des Chlorhydrates ohne Störung vertragen. Der Harn gab direkt die p-Amidophenolreaktion.

Zur Ausscheidung von erheblichen Mengen Eiweiß kam es nicht; der Harn gab auf Zusatz von Salpetersäure nur schwache Trübung. Ein Teil des Harnes wurde direkt mit Jodwasserstoffsäure ausgefällt, das Filtrat alkalisch gemacht und destilliert; das Destillat färbte sich auf Zusatz von Eisenchlorid rotviolett, enthielt also zweifellos Dimethyl-o-amidophenol. Ein Teil des Harnes wurde der Fällung mit Bleilösung unterworfen; der mit destilliertem Wasser gut ausgewaschene zweite Bleiniederschlag wurde mit Schwefelsäure zersetzt und alkalisch destilliert; es ging kein o-Dimethylamidophenol über, wohl aber konnte durch Äther dem Destillationsrückstande die p-Verbindung entzogen werden. Der mit Bleiacetatlösung direkt im Harn erzeugte Niederschlag hingegen enthielt in nicht unerheblichen Mengen die o-Verbindung.

Aus diesem Verhalten geht hervor, daß das Oxyd im Organismus des Warmblüters wenigstens teilweise dieselbe Umlagerung erfährt, welche **Bamberger** und **Tschirner**[1]) bei der Einwirkung des **Formaldehyds** und der **schwefligen Säure** auf das Oxyd sich vollziehen sahen:

$$C_6H_5\text{—}N(CH_3)_2{=}O \longrightarrow C_6H_4(OH)\text{—}N(CH_3)_2$$

$${}_2(H_3C) = N = O \qquad\qquad {}_2(H_3C) = N \;\; (OH)$$

Im zweiten Bleiniederschlage konnte noch die Glykuronsäureverbindung des Oxyds selbst enthalten sein — vgl. obige Hydratformel; die durch Schwefelsäure vom Blei befreite Flüssigkeit wurde zunächst mit Schwefel-

[1]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 32, 1882 (1899).

säure am Rückflußkühler gekocht, um eine Spaltung der darin enthaltenen gepaarten Verbindungen herbeizuführen, alsdann der Einwirkung des Formaldehyds ausgesetzt in der von Bamberger und Tschirner angegebenen Weise. Eine Bildung der o-Verbindung hatte nicht stattgefunden.

Eine Beständigkeit des Dimethylanilinoxyds im Organismus hat sich demnach nicht nachweisen lassen; in keinem Falle existiert ein Paarungsprodukt mit Glykuronsäure, das ein basisches Bleisalz gibt.

Diese Resultate lassen immerhin die Annahme zu, daß bei der Einfuhr von Dimethylanilin eine primäre Oxydbildung statt hat; doch scheint diese nur in beschränktem Umfange einzutreten, indem der größte Teil durch Oxydation zur p-Hydroxylverbindung übergeführt wird.

Das Dimethylanilinoxyd scheint so langsam im Organismus seinen Sauerstoff abzugeben, daß die entstehenden Mengen Dimethylanilin zur Entfaltung einer schädlichen Wirkung nicht ausreichen; freilich könnte man auch annehmen, daß im Organismus neben der Wanderung des Sauerstoffs vom N in die o-Stellung auch eine solche in die p-Stellung zum N stattfände und es somit infolge der gleichzeitigen Bildung von o- und p-Dimethylamidophenol gar nicht zum Entstehen von Dimethylanilin kommt.

Wegen seiner kristallinischen Beschaffenheit und damit leichten Nachweisbarkeit habe ich das p-mono-Bromdimethylanilin eingehend untersucht; man gewinnt es nach A. Weber[1]) durch Einwirken von Brom auf Dimethylanilin in Eisessig. Mittels Natronlauge wird das Reaktionsprodukt aus der verdünnten essigsauren Lösung ausgefällt und aus Alkohol umkristallisiert. Schmelzpunkt 55°; silberweiße Blättchen. — Mengen von 1 g in Emulsion mit Gummi arab. wurden von Kaninchen lange Zeit vertragen, wenn sie nur jeden zweiten Tag dargereicht wurden; der mit Mineralsäure stark angesäuerte Harn wurde zunächst einige Stunden am Rückflußkühler gekocht, kalt filtriert und unter Vermeidung von Erwärmen natronalkalisch gemacht. Es entstand ein Niederschlag, der sich absetzte, aber beim Versuche, ihn mit Wasser zu waschen, sich wieder löste bis auf einen geringfügigen Rest, der anorganisch war. Der Harn enthielt also keine Spur von p-Bromdimethylanilin, auch nicht mit Glykuronsäure verbunden. — Beim Destillieren der alkalischen Flüssigkeit ging in reichlichen Mengen ein Öl über, das mit Eisenchlorid die für die o-Amidophenole charakteristische Violettfärbung gab. Auch wenn der Harn von

---

[1]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 8, 715 (1875).

vornherein nach dem Bleiverfahren verarbeitet wurde, enthielt der zweite Bleiniederschlag reichlich p-Bromdimethyl-o-amidophenol.

Das reichliche Auftreten dieser Verbindung im Destillate benutzte ich, um seine Wirkung auf das Kaninchen selbst zu untersuchen. Die unter Zusatz von Salzsäure eingeengten Destillate, welche im ganzen einige Gramm der Bromverbindung enthalten haben mögen, wurden einem Kaninchen innerlich eingegeben. Nach etwa 30 Minuten trat ein Taumelzustand ein. Ausbleiben der Reaktion auf starke sensible Reize; durch mehrere Stunden Verharren in Seitenlage. Tags darauf wird das Tier tot aufgefunden.

Der Harn des Tieres wurde nach dem Bleiverfahren verarbeitet; der zweite Bleiniederschlag wurde mit Schwefelsäure zersetzt und reduzierte direkt Fehlingsche Lösung; nach dem Kochen mit Mineralsäure war die Reduktionsfähigkeit übrigens nicht stärker.

Es ist bemerkenswert, daß das Dimethyl-o-amidophenol, wenn es in p-Stellung zur Amidogruppe ein Atom Brom trägt, eine Paarung mit Glykuronsäure eingeht, deren Produkt im zweiten Bleiniederschlage enthalten ist, während Dimethyl-o-amidophenol selbst, wie wir oben bei der Besprechung der Stoffwechselprodukte des Dimethylanilinoxyds sahen, jedesfalls nicht in nennenswerten Mengen eine Glykuronsäureverbindung gibt, welche im zweiten Bleiniederschlage auftritt; das gleiche konnte ich beim o-Amidophenol selbst feststellen, während die p-Verbindung sowie ihr Dimethylderivat eine im zweiten Bleiniederschlage erscheinende gepaarte Verbindung liefert.

2. Phenylalkylammoniumbasen.

Bei der Verarbeitung des nach Darreichung von Dimethylanilin gelassenen Harnes erhielt ich aus dem Jodwasserstoffniederschlage eine Verbindung, welche die Eigenschaft hatte, erst nach dem Kochen mit Mineralsäure die p-Amidophenolreaktion zu geben; die erhaltenen Mengen waren zu gering, als daß eine Reindarstellung Aussicht auf Erfolg gehabt hätte. Die gleichen Eigenschaften besitzt nun die von Peter Griess[1]) aus p-Amidophenol durch Behandeln mit drei Molekülen Methyljodid erhaltene Verbindung, das p-Trimethylphenolammonium. Schon Griess hat angegeben, daß bei der trockenen Destillation des salzsauren Salzes Dimethyl-p-amidophenol entsteht. Dieses p-Trimethylphenol-

$$C_6H_4\left\langle\begin{matrix} O \\ | \\ N.(CH_3)_3 \end{matrix}\right. + HCl \rightarrow C_6H_4\left\langle\begin{matrix} OH \\ N(CH_3)_2 \end{matrix}\right. + CH_3.Cl$$

[1]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 13, 249 (1880).

ammonium konnte selbst in Dosen von 1 g an mittelgroße Kaninchen verabreicht werden, ohne daß diese Erscheinungen zeigten; der Harn enthielt unveränderte Substanz; gepaarte Glykuronsäuren traten nicht auf.

Es scheint also ein Teil des verfütterten Dimethylanilins eine Methylierung am Stickstoff der Amidogruppe zu erfahren; dieser Anteil entgeht der Paarung mit Glykuronsäure. Ein Teil aber geht nur die Oxydation ein und findet sich als Paarungsprodukt mit Glykuronsäure im zweiten Bleiniederschlage.

Eine Methylierung am N der Amidogruppe ist sonst bisher nicht zur Beobachtung gekommen, obschon W. L. Halle[1]) in seinem Versuche die Bildung des Adrenalins im Organismus aus Tyrosin herzuleiten, eine solche ohne weiteres als sichergestellt annimmt, insofern er durch Methylierung am Stickstoff übergehen läßt das

Dioxyphenyläthylamin in Dioxyphenylmethyläthylamin

$$C_6H_3(OH)_2 . CH_2 . CH_2 . NH_2 \longrightarrow C_6H_3(OH)_2 . CH_2 . CH_2 . NH . CH_3.$$

Es war nun von nicht geringem Interesse, ob im Organismus solche Derivate, die bereits fünfwertigen N enthalten, durch Oxydation am Benzolkern in jene Trimethylphenolammoniumbasen übergehen können.

Ich stellte durch Anlagerung von Methyljodid an Dimethylanilin das Trimethylphenylammoniumjodid dar und daraus durch Behandeln mit Silberoxyd das Trimethylphenylammoniol $C_6H_5 . \underset{OH}{N} . (CH_3)_3$. Es zeigte sich nun, daß diese Base eine enorme Giftigkeit besitzt; sie ist sogar noch stärker giftig als das Tetramethylammoniumhydroxyd $\underset{OH}{N}-(CH_3)_4$. Die muskarinartige Wirkung der Tetramethylverbindung geht durch Ersatz eines Methyls durch Phenyl verloren. Auch die entsprechenden Derivate des o- und p-Dimethyltoluidins zeigen diese Wirkung nicht; dagegen fand ich sie andeutungsweise beim Benzylderivat, das ich durch Einwirkung von Benzylbromid auf Trimethylamin darstellte. Der bisher nicht bekannte Körper $H_5C_6 . H_2C . \underset{Br}{N}-(CH_3)_3$ schmilzt bei 215° und kann aus Wasser umkristallisiert werden.

---

[1]) Diese Beiträge 8, 277 (1906).

Das Trimethylbenzylammoniumbromid zeigt am Kaninchen eine auffallend geringe Giftigkeit; selbst Mengen von 0,35 g, innerlich in wässeriger Lösung gereicht, wurden ohne Wirkung vertragen. 0,8 g töteten im Laufe von 20 Minuten; die Tiere legen sich nach einigen vergeblichen Springversuchen zur Seite, atmen mühsam, während der Herzschlag noch kräftig ist; schließlich steht die Atmung still. Gepaarte Glykuronsäuren konnten im Harn nicht nachgewiesen werden.

Zum Zweck der vergleichenden Untersuchung habe ich eine größere Zahl einfacher Ammoniumbasen dargestellt. Alle bringen beim Frosche in Mengen von 2 bis 4 mg völlige Lähmung hervor. Es wurden außer den käuflichen Tetraäthyl- und Tetrapropylammoniumverbindungen untersucht Trimethylphenylammoniumjodid aus Dimethylanilin und CH_3J, Dimethylphenylbenzylammoniumbromid aus Dimethylanilin und Benzylbromid, Dimethylphenylallylammoniumjodid aus Dimethylanilin und Allyljodid, Trimethyl-p-tolylammoniumjodid aus Dimethyl-p-toluidin und CH_3J, Trimethyl-o-tolylammoniumjodid aus Dimethyl-o-toluidin und CH_3J.

Trimethylphenylammoniumjodid, die am stärksten wirkende Ammoniumbase, führte bereits in Mengen von 0,1 g innerlich nach etwa einer Stunde die charakteristische Vergiftung herbei; bei subkutaner Injektion war bereits 0,01 g in kurzer Zeit tödlich. Die Toxizität blieb unverändert, wenn ich im Molekül mittels Silberoxyd das Halogen durch Hydroxyl ersetzte. Auffallend war das reichliche Auftreten kapillarer Blutungen in der Schleimhaut des Dünndarms auch nach ausschließlicher wiederholter subkutaner Injektion jener kleinen Dosen; dabei stellte sich deutlich eine stärkere Empfindlichkeit der Tiere gegen die Giftigkeit ein, so daß die anfänglichen Dosen bald nicht mehr vertragen wurden.

Das Trimethyl-o-tolylammoniumjodid zeigte eine etwas geringere Giftigkeit; erheblich weniger giftig war das Methyljodidderivat des p-Bromdimethylanilins (Schmelzpunkt 195°); 0,3 g (Mol 342) innerlich wurden hier eben noch vertragen.

Es gelang mir bei keinem dieser Trimethylphenylammoniole nachzuweisen, daß eine Oxydation am Benzolringe erfolgt mit Übergang in die wenig differente Form des Trimethylphenolammonium:

$$\underset{\displaystyle OH}{H_5C_6{-}\dot{N}\,.\,(CH_3)_3} \longrightarrow H_4C_6\left\langle\begin{array}{l} O \\ | \\ N\,.\,(CH_3)_3. \end{array}\right.$$

Man kann sich wohl so ausdrücken: Gelänge es dem Organismus, die Oxydation am Benzolring auszuführen, so könnten jene Trimethylphenylammoniole keine so intensive Wirkung zeigen.

Während also der am N befindliche Sauerstoff des Dimethylanilinoxyds vom Organismus anscheinend benutzt wird zur Oxydation des Benzolkerns, gelingt es im Falle der eigentlichen Ammoniumbasen dem Organismus nicht, eine entsprechende Verschiebung im Molekül vorzunehmen.

Mit Rücksicht auf die starke Herabsetzung der Giftigkeit des Trimethylphenylammoniols durch eine zwischen den Stickstoff und den Benzolkern eingeschobene Methylengruppe: Trimethylbenzylammoniol, lag es nahe, zu untersuchen, welchen Einfluß in diesem Falle die Oxydation am Benzolring ausübt. Es kam also eine Verbindung

$$H_4C_6\left\langle\begin{matrix}OH\\ CH_2.\underset{\displaystyle Br}{\overset{}{N}}.(CH_3)_3\end{matrix}\right. \quad \text{bzw.} \quad H_4C_6\left\langle\begin{matrix}O\\ CH_2.N.(CH_3)_3\end{matrix}\right.,$$

also ein Trimethyloxybenzylammonium in Betracht. Das Entstehen einer solchen Verbindung wäre zu erwarten, wenn man ein Phenol mittels Formaldehyd mit Dimethylamin kondensierte und dann am tertiären Stickstoff Halogenalkyl anlagerte. Während nun, wie ich früher fand [1], Thymol mit Diäthylamin und den höheren sekundären Aminen der Fettreihe sich gut kondensieren läßt, gelingt dies nicht mit Dimethylamin. Dagegen entsteht nach den Untersuchungen von K. Auwers und A. Dombrowski [2] leicht und in guter Ausbeute das β-Naphtolderivat. Schmelzpunkt 74 bis 75°:

$$C_{10}H_6\begin{matrix}CH_2.N.(CH_3)_2\\ OH\end{matrix}$$

Es zeigt in besonderer Stärke die Amidwirkung, wie ich sie kürzlich bei einigen sekundären und tertiären Aminen beschrieb [1]. Die Wirkung des β-Naphtolderivates war bedeutend stärker als die des Thymylmethylendiäthylamids. Am Kaninchen führten bereits 0,9 g innerlich einen Zustand hochgradigster Aufgeregtheit herbei, dann Krämpfe, Seitenlage, auffallend leichte Erholung. Der

[1]) Arch. f. experim. Path. u. Pharm. 54, 126 (1906).
[2]) Liebigs Ann. 344, 290 (1906).

gelassene Harn war von auffallend gelber Farbe, welche sich auch dem zweiten Bleiniederschlage mitteilte; dieser enthielt eine nach dem Kochen mit Mineralsäure Fehlingsche Lösung reduzierende Substanz. — Das Methyljodidderivat erhielt ich durch Zusatz von Methyljodid zur alkoholischen Lösung der Naphtolbase; die entstehende Ammoniumbase sinterte bei 260° zusammen. 0,25 g der Ammoniumbase waren bei innerlicher Darreichung bereits in etwa einer Stunde tödlich unter den gleichen Erscheinungen, die auch den anderen Ammoniumbasen zukommen.

Es ergibt sich demnach das sehr eigenartige Resultat, daß Oxydation des direkt am Stickstoff stehenden Benzolrestes aus einer sehr giftigen eine ungiftige Verbindung macht, während Oxydation des durch den Methylenrest vom Stickstoff getrennten Benzolrestes aus einer relativ ungiftigen Verbindung (vgl. das Benzylderivat) eine giftige macht.

Im folgenden sind diejenigen Ammoniumbasen zusammengestellt, bei welchen die fünfte Valenz des N durch O, nicht freies Hydroxyl, gebunden ist.

$_3(CH_3).N.CH_2$ / O—OC — 1. Betaïn.

C_6H_4 (COO, $N.(CH_3)_3$) — 2. Benzbetaïn.

C_6H_4 (O, $N.(CH_3)_3$) — 3. Trimethylphenolammonium.

(Naphthalinring)—O, H_2C—$N.(CH_3)_3$ — 4. Trimethylmethylennaphtolammonium.

(Benzolring)—O, $H_2C \cdot N \cdot$ (CH_3; Piperidinring CH_2 CH_2 CH_2 CH_2 CH_2) — 5. Piperidylmethyloxybenzylammonium.

Nur die mit 4. und 5. bezeichneten Ammoniumbasen zeigen giftige Wirkung, die aber erheblich hinter der der oben besprochenen Ammoniumbasen zurückbleibt. Es erklärt sich nun, warum die früher schon beschriebene [1]) Base „5“ von verhältnismäßig geringer Wirkung ist.

---

[1]) Arch. f. experim. Path. u. Pharm. 44, 299 (1900).

Kürzere Mitteilungen.

3. Zur Methodik der Ammoniak- und Harnstoffbestimmungen im Harn.

Von Karl Spiro.

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Für die chemische Untersuchung des Harns war es ein großer Fortschritt, als K. A. H. Mörner und John Sjöqvist[1]) im Jahre 1891 ihre Methode zur Bestimmung des Harnstoffs angaben. Diese beruht bekanntlich darauf, daß in baryt-alkalischer Lösung durch Alkohol und Äther fast alle stickstoffhaltigen Substanzen außer Harnstoff gefällt werden und daß im Filtrat nach Vertreibung des Ammoniaks der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt wird. Die einzige Schwierigkeit dieses Verfahrens liegt in der Vertreibung des Ammoniaks, die zur Vermeidung einer Zersetzung des Harnstoffs nach der Vorschrift von Mörner und Sjöqvist bei einer 60° nicht übersteigenden Temperatur stattzufinden hat und die man nach H. Huppert[2]) am besten im Vakuum vornehmen soll. Eine quantitative Bestimmung des Ammoniaks ist dabei, da ein Teil der Ammonsalze durch Alkoholäther gefällt wird (Tripelphosphat), nicht möglich.

Nun ist die alte zwar zuverlässige, aber zeitraubende Bestimmung des Ammoniaks nach Schlösing-Neubauer[3]) sehr viel bequemer und in kürzerer Zeit ausführbar geworden, seitdem C. Wurster[4]) zuerst gezeigt hat, daß das Ammoniak leicht im Vakuum abgedunstet werden kann[5]) und seitdem neuerdings O. Folin[6]) angegeben hat, daß ein kräftiger Luftstrom auch innerhalb Stunden alles Ammoniak aus

---

[1]) Skandinavisches Archiv für Physiologie 2, 448; vgl. auch K. A. H. Mörner, ebenda 14, 297.

[2]) Analyse des Harns, 10. Aufl., S. 812.

[3]) Journ. f. prakt. Chem. (2) 64, 177.

[4]) Zentralblatt f. Physiologie 1887, S. 485.

[5]) Die Apparatur hat durch die Vorschläge von Nencki-Zaleski (Archiv f. exp. Path. u. Pharm. 36, 385), Schittenhelm (Zeitschr. f. physiol. Chemie 39, 73), Krüger und Reich (Jahresbericht f. Tierchemie 32, 309) mannigfache Verbesserung erfahren.

[6]) Zeitschr. f. physiol. Chemie 32 ; 37, 161.

dem alkalisierten Harn austreibt. Vielfache Kontrollbestimmungen, die ich mit dem Folinschen Verfahren ausgeführt habe, ergaben mir die völlige Zuverlässigkeit seiner Angaben Es erwies sich dabei als irrelevant, wenigstens für den menschlichen und Hundeharn, ob man dessen Alkalisierung durch Soda, Baryt oder Kalk bewirkte, wenn man den Luftstrom bei niederer Temperatur durchstreichen ließ. Das Verfahren erwies sich, namentlich als ich durch eine elektrisch getriebene Pumpe das Durchströmen von Luft bewirken ließ, als sehr bequem, um eine Anzahl von Ammoniakbestimmungen nebeneinander (vier hintereinander geschaltete Apparate) auszuführen.

Mit diesem Verfahren läßt sich nun die Harnstoffbestimmung nach Mörner und Sjöqvist sehr einfach in der Art ausführen, daß man die Fällung mit Alkoholäther erst nach der quantitativen Vertreibung des Ammoniaks vornimmt, indem man dann den mit Baryt versetzten ammoniakfreien Harn mit Alkoholäther fällt und im Filtrat oder einem aliquoten Teil desselben direkt den Stickstoff bestimmt. Da man den Alkoholäther nach dem Ansäuern bei beliebiger Temperatur vertreiben kann, so wird das Verfahren dadurch vereinfacht und abgekürzt.

Ich verfahre also in folgender Weise: 25 ccm Harn werden in einem hohen schmalen Standgefäß, das bei 270 bzw. 400 ccm Marken trägt, mit $1^1/_2$ g Baryt und einer niedrigen Schicht Petroleum versetzt. Letztere dient zur Vermeidung allzustarken Schäumens, kann aber, wenn das Gefäß hoch genug, bzw. der Luftstrom stark genug ist, auch wegbleiben, bzw. durch Toluol oder Alkohol ersetzt werden.

Das Gefäß trägt oben einen doppelt durchbohrten Gummistopfen, durch dessen eine Öffnung die ammoniakfreie Luft bis auf den Boden des Gefäßes geführt wird. Durch seine andere Bohrung geht ein mit Sicherung versehenes Glasrohr, das oben ein mit Glaswolle und Glasperlen versehenes Rohr trägt, das wiederum luftdicht mit der Vorlage verbunden ist. Für das Einleiten des Luftstromes in die vorgelegte Säure hat sich die von Folin angegebene feinlöcherige Glasröhre [1]) gut bewährt. Nachdem alles Ammoniak abdestilliert ist, wird das Glasrohr usw. mit Alkohol ausgespült, mit Alkohol bis zur Marke 270, mit Äther bis zur Marke 400 aufgefüllt, der Zylinder zugekorkt, gut durchgeschüttelt und stehen gelassen. Man kann nun entweder allen in der Lösung gebliebenen Stickstoff, oder den in einem aliquoten Teil bestimmen (Doppelbestimmungen). Ich habe mich meist mit der Bestimmung in 100 ccm (gleich 6,25 ccm Harn) begnügt, die ich in einen Kjeldahlkolben entleerte, ansäuerte und nach Entfernung des Alkoholäthers direkt nach Kjeldahl verarbeitete. Ist im Harn auf vorhandene Hippursäure Rücksicht zu nehmen, so ist natürlich die Bearbeitung nach Salaskin-Zaleski [2]) oder Braunstein [3]) einzuschalten.

Abgesehen von der Einfachheit des Verfahrens, das außer einer Saugpumpe nur die Apparatur des Kjeldahlverfahrens erfordert, dürfte

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 169.
[2]) Ebenda 28, 73.
[3]) Ebenda 31, 381.

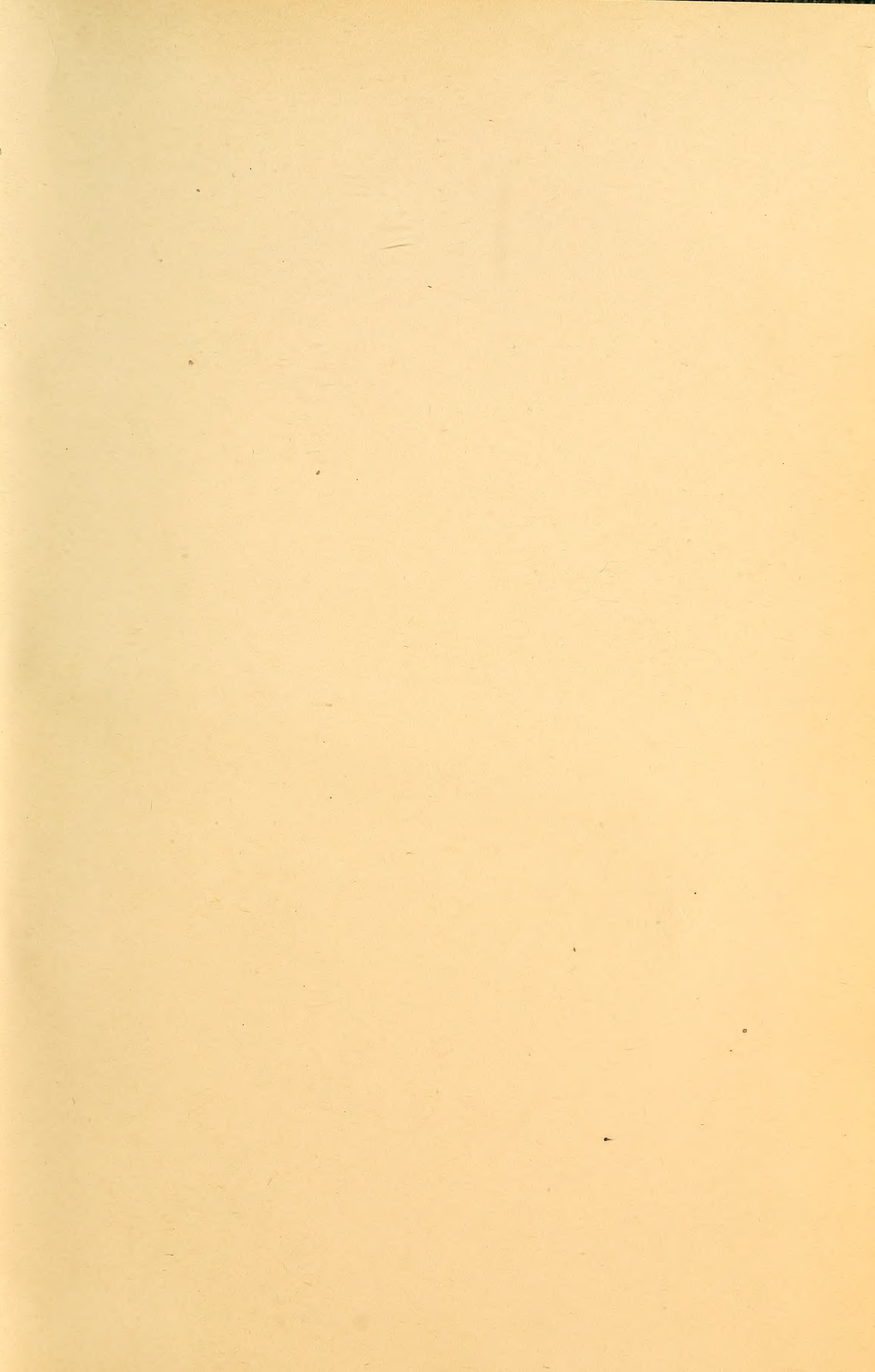
es sich auch dort empfehlen, wo nur wenig Harn, z. B. von Säuglingen, der Untersuchung zur Verfügung steht.

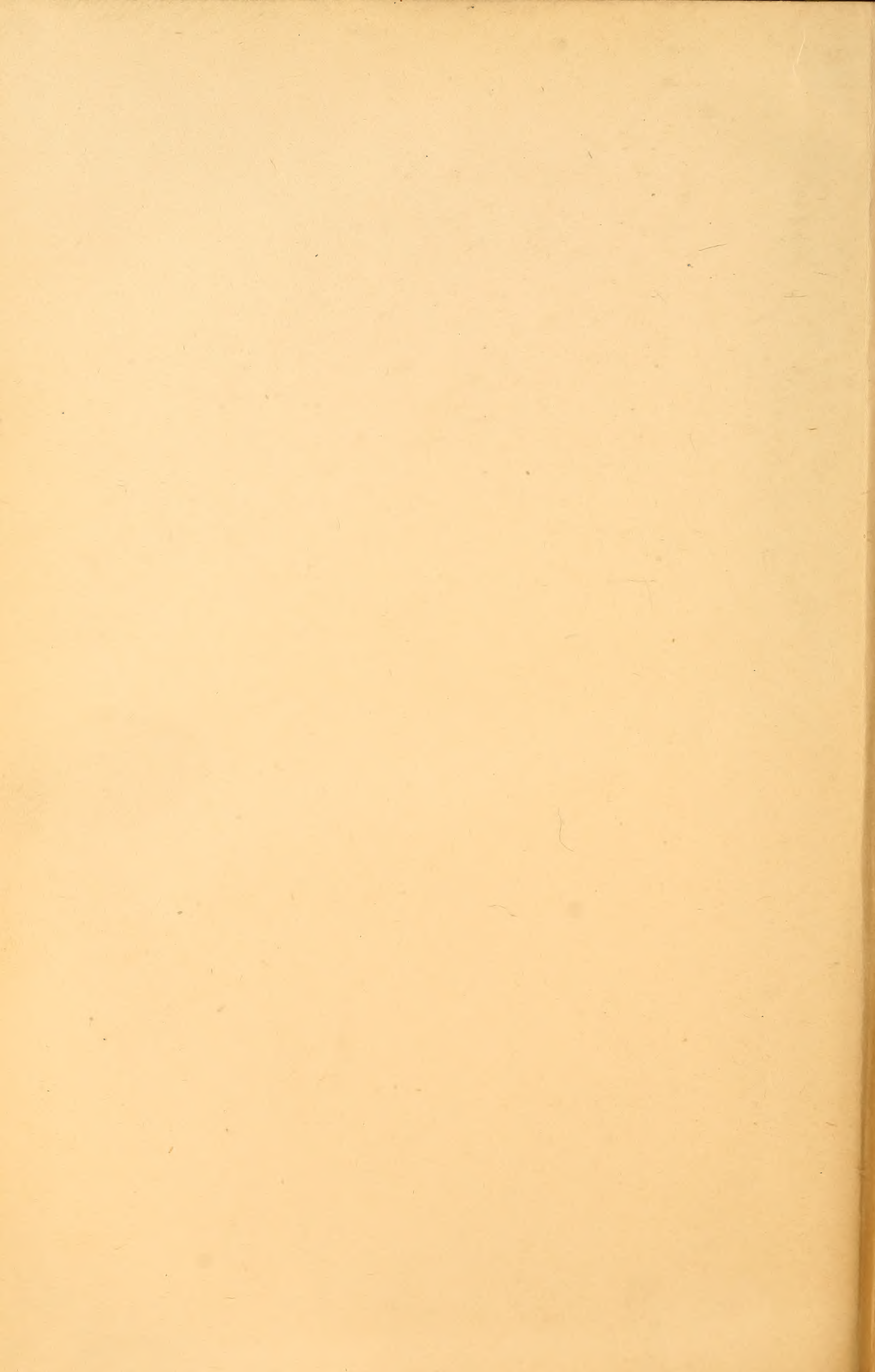
Ich habe im Laufe des vergangenen Semesters während mehrerer Stoffwechselreihen hunderte derartiger Analysen ausgeführt und durch meine Praktikanten ausführen lassen und mich von der Brauchbarkeit der Methode überzeugt. Als Mittelzahlen fand ich bei einem Hunde im Stoffwechselgleichgewicht (Futter: Hundekuchen) im Prozentgehalt des Gesamtstickstoffs. Ammoniak 4,32 Proz., Harnstoff nach dem Phosphorwolframsäure-Phosphorsäureverfahren 82,4 Proz., nach dem obigen Verfahren 84,2 Proz.

Verzeichnis der Mitarbeiter des neunten Bandes.










3 2044 106 231 665

